

ANNÉE 1970-1971

THÈSE

SÉRIE E n° 232

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Jacqueline BERNARD

PHARMACIEN - DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
DIPLOMÉE DE SÉROLOGIE
DIPLOMÉE D'ÉTUDES PHARMACEUTIQUES SPÉCIALISÉES
MAÎTRE-ASSISTANTE A L'U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES DE PARIS V

Contribution à l'étude analytique
des Protéolysats injectables
mise au point d'une méthode de contrôle

Soutenue le 8 Juillet 1971

Jury : Mademoiselle S. LAMBIN

Présidente

Messieurs

A. GERMAN

A. DESVIGNES

} Examineurs

ANNÉE 1970-1971

THÈSE

SÉRIE E n° 232

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Jacqueline BERNARD

PHARMACIEN - DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
DIPLOMÉE DE SÉROLOGIE
DIPLOMÉE D'ETUDES PHARMACEUTIQUES SPÉCIALISÉES
MAITRE-ASSISTANTE A L'U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES DE PARIS V

Contribution à l'étude analytique
des Protéolysats injectables
mise au point d'une méthode de contrôle

Soutenue le 8 Juillet 1971

Jury : Mademoiselle S. LAMBIN

Présidente

Messieurs

A. GERMAN

A. DESVIGNES

} Examineurs

THÈSE

Présentée

au Faculté de Médecine de Paris

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

par

M.

Jacques BERNARD

né le 15 Mars 1885 à Paris

Par son père

M. Jacques Bernard, pharmacien à Paris

et sa mère M. Marie Bernard, née M. Bernard

à Paris le 15 Mars 1885



Contribution à l'étude analytique
des Protocollars injectables
au point d'une méthode de contrôle

Paris le 2 Août 1911

Président : M. BERNARD
Rapporteur : M. BERNARD
Examinateurs : M. BERNARD
M. BERNARD

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA FAMILLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543714_0037

A MADEMOISELLE LE PROFESSEUR S. LAMBIN,

Professeur de Microbiologie à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de l'Université René Descartes
Membre de l'Académie de Pharmacie

qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

En témoignage de ma respectueuse gratitude et de ma
profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. GERMAN,

Professeur de virologie et d'immunologie de l'U.E.R. des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes
Membre de l'Académie de Pharmacie,
Pharmacien Chef des Hopitaux de Paris,

qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

En témoignage de ma très vive reconnaissance et de mon
respectueux dévouement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. DESVIGNES,

Professeur de Cryptogamie et de Microbiologie Industrielle à l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université
René Descartes.

qui m'a prodigué ses conseils avec beaucoup de sollicitude lors de
la rédaction de ce travail.

En témoignage de ma sincère reconnaissance et mon profond
attachement.

A MONSIEUR R. BERNIER,

Docteur en Pharmacie,

Membre de l'Académie de Pharmacie.

à qui je dois le sujet de mon travail, et qui m'a accordé, avec la plus grande bienveillance, le privilège de ses conseils éclairés et de ses directives.

En témoignage de ma déférente gratitude et de mon respectueux attachement.

A MONSIEUR Fr. BOURILLET,

Docteur en Pharmacie,

Chef de Travaux à l'U.E.R. Bichat-Beaujon de l'Université Paris VII.

qui m'a apporté, par ses conseils judicieux et ses critiques avisées, une aide précieuse au cours de ce travail.

En témoignage de ma très vive reconnaissance.

A TOUS MES AMIS DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE, enseignants et techniciens,

qu'ils reçoivent mes bien vifs remerciements pour la confiance et le soutien amical qu'ils m'ont toujours accordés. Mes remerciements vont, plus précisément, à Mademoiselle F. SEBASTIEN qui a partagé mes difficultés et m'a toujours apporté son aide efficace, en particulier lors des premières utilisations d'un appareillage nouvellement introduit en France. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma profonde affection.

INTRODUCTION

Les protéolysats ou hydrolysats injectables sont préparés par digestion enzymatique ou hydrolyse chimique de protéines naturelles telles que la caséine, la lactalbumine, le sang, la fibrine, etc... Ils sont destinés à compenser les besoins azotés spécifiques de l'organisme en état de dénutrition ; leur valeur thérapeutique dépend de leur composition et de l'équilibre entre les divers acides aminés, dont huit sont considérés, depuis les travaux de W.C. ROSE (32-33-34) comme indispensables : leucine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine ; deux autres : l'histidine et l'arginine peuvent être ajoutés à cette liste (36). Ces protéolysats, destinés à l'administration par perfusion intraveineuse (ou sous cutanée dans certaines conditions) peuvent être enrichis par addition de principes énergétiques (glucose, sorbitol, etc...) de vitamines, d'éléments minéraux, etc... Une mise au point de la question a été faite en 1949 par G. SCHUSTER et coll. (36). Une étude très détaillée existe dans le cahier n° 3 de la collection de M. VIGNERON : " Les amino-acides dans l'alimentation parentérale " par J. TREMOLIERES (39). Enfin, une mise au point récente a été faite par G. GAZET du CHATELIER (9).

Le mode d'obtention des protéolysats et des hydrolysats est, en général, protégé par des brevets industriels et reste inconnu dans le détail, mais le principe peut être résumé comme suit :

Les protéolysats sont le résultat de la dégradation enzymatique de protéines d'origines diverses (caséine, plasma, fibrine, lactalbumine). Certains auteurs (MUELLER et coll. 24) préconisent une digestion trypsique ; d'autres (MADDEN 21), une digestion papainique. Cette action enzymatique ne permet pas d'obtenir une dégradation complète des protéines ; les protéolysats contiennent donc un mélange d'acides aminés libres et de peptides à chaînes, plus ou moins longues. Par contre, cette action douce évite la destruction de certains acides aminés fragiles (méthionine, tryptophane) et les conserve sous leur forme naturelle.

Les hydrolysats sont le résultat d'une hydrolyse acide ou alcaline qui provoque une attaque beaucoup plus brutale de la protéine. A partir des mêmes substrats, la dégradation obtenue est nettement plus poussée et peut aboutir à l'obtention d'un produit exempt de peptides et ne renfermant que des acides aminés libres. Cependant l'hydrolyse acide a l'inconvénient de détruire partiellement ou totalement certains acides aminés essentiels, comme la lysine, la méthionine, le tryptophane ; ce qui amène les fabricants à ne procéder qu'à des hydrolyses partielles afin de conserver ces amino-acides indispensables. Par contre, l'hydrolyse alcaline, si elle respecte davantage les acides aminés essentiels, a l'inconvénient de les racémiser. Cet inconvénient ne paraît plus majeur depuis les nombreux travaux (cités par G. SCHUSTER 36) qui ont montré que, si l'équilibre azoté chez l'homme ne peut être réalisé que par l'utilisation des formes L naturelles de la lysine, de la leucine, de l'isoleucine et de la thréonine, par contre, en ce qui concerne la phénylalanine et la méthionine, les dérivés D, L ou DL ont sensiblement les mêmes propriétés biologiques.

Les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes expliquent que certains fabricants opèrent des mélanges de produits obtenus par diverses méthodes d'hydrolyse, afin d'obtenir des solutions mieux équilibrées en acides aminés indispensables.

Un troisième type de préparations plus complexes consiste à fractionner sur colonne de résine un hydrolysate de protéines, ce qui permet de procéder ensuite à un mélange des diverses fractions obtenues, dans des proportions déterminées, et de réduire ainsi le taux de certains acides aminés moins désirables, comme les acides aspartique et glutamique qui seraient en partie responsables de l'apparition de nausées et de vomissements (19). Cette technique permet également de compléter le mélange final en acides aminés essentiels, tels que la méthionine et le tryptophane, détruits au cours de l'hydrolyse.

Une importante quantité de glycine est quelquefois ajoutée, qui aurait pour but " d'améliorer la tolérance des malades aux injections intraveineuses des mélanges " et qui "serait capable, à elle seule, d'assurer plus de 40 % des besoins azotés spécifiques des dénutris " (G. GAZET du CHATELIER 9).

Enfin, il existe dans le commerce des solutés d'acides aminés synthétiques, qui sont des solutions aqueuses d'acides aminés synthétiques de forme DL. Ceux-ci renferment, en général, une forte proportion de glycine pour les raisons qui sont indiquées plus haut et de plus pour des raisons économiques.

Depuis les premières recherches de J.H. MAGNUSSON (22) et d'A.F. HARTMANN (11-12) concernant l'administration des acides aminés par voie orale ou parentérale, de nombreux travaux ont été effectués pour déterminer la valeur nutritive de chaque acide aminé (32-33-34), l'action favorable de la supplémentation des protéolysats par des substances glucidiques (8-25-30-44), l'utilisation et le mode d'administration (14-15-16-17-20-29-31-37-38-42-43) de ces préparations. Mais peu d'auteurs se sont intéressés à l'analyse des mélanges d'acides aminés et au contrôle de ces préparations. P. MONNIER, R. HUGUET et J. GRAS (23) en 1958 ont cependant analysé six protéolysats ou hydrolysats commerciaux en essayant d'évaluer quantitativement le contenu en acides aminés libres par chromatographie sur papier. J. TREMOLIERES (39) en 1959 donne des analyses plus précises de six autres préparations. M. ROUX (35) préconise un contrôle physiologique.

La Pharmacopée française (édition de 1965), comme la plupart des Pharmacopées étrangères, ne comporte aucune monographie concernant les protéolysats injectables. Seule, la Pharmacopée américaine USP. XVIII mentionne ces préparations et indique les exigences auxquelles elles doivent répondre. En France, trois notes techniques parues dans Pro Pharmacopoea (28) ont cependant constitué une mise au point de ce problème.

La première, parue en 1961, se trouve annulée par les deux autres en 1963, qui traitent séparément du problème des protéolysats obtenus à partir de protéines naturelles et des solutions d'acides aminés synthétiques.

Quelles sont actuellement les méthodes d'investigation susceptibles de donner des renseignements sur la composition et, par conséquent, sur la valeur nutritive de ces préparations ? La teneur en azote total et la teneur en azote α -aminé, valeurs qui permettent de calculer le rapport :

$$\frac{N \alpha - \text{aminé,}}{N \text{ total .}}$$

sont les premières indications donnant une idée de la valeur du soluté . La Pharmacopée U.S.P. XVIII indique que ce rapport ne doit pas être inférieur à 0,50, c'est-à-dire qu'au moins 50 % de l'azote total présent doit se trouver sous forme d'azote α -aminé. C'est également le pourcentage indiqué dans la 116^e note technique de Pro Pharmacopoea.

Mais, ces valeurs permettent-elles, à elles seules, de juger de la qualité d'un protéolysat au point de vue nutritionnel ? Il serait certainement utile de connaître la composition en amino-acides, car l'absence ou une teneur trop faible en certains amino-acides essentiels peut déséquilibrer l'ensemble et, de ce fait, diminuer la valeur nutritive de la préparation.

La note 72 de Pro Pharmacopoea en 1961, décrivait, en plus de la séparation qualitative par chromatographie sur papier, laquelle fait encore partie des réactions d'identité indiquées dans les notes 115 et 116 de 1963, le titrage spécifique de chaque amino-acide essentiel par la méthode microbiologique d'ADRIAN⁽¹⁾. Cette méthode, qui dose les acides aminés sous la forme L, permet, avec une précision de $\pm 10 \%$, de connaître les concentrations de huit acides aminés essentiels seulement, alors qu'il peut être intéressant de déterminer la quantité des autres acides aminés présents dans un protéolysat. Dans les notes 115 et 116, ce dosage ne figure plus.

Il existe maintenant une méthode plus rapide de détermination qualitative et quantitative des amino-acides libres d'une telle préparation, méthode qui utilise un appareil automatique d'analyse par chromatographie sur colonne. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant de reprendre le problème en utilisant cette technique.

(4)

Nous avons donc, au cours de ce travail :

- d'une part, recherché la précision de la technique physico-chimique automatisée appliquée au dosage des acides aminés libres en travaillant sur des solutions synthétiques, puis appliqué la technique à des protéolysats injectables du commerce,
- d'autre part, mis en évidence et séparé, par différentes techniques, la fraction peptidique de la fraction contenant les acides aminés libres ; ce qui nous a amenée à établir une méthode de contrôle de ces préparations.

Ière PARTIE

ANALYSE des ACIDES AMINES LIBRES

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'analyse des acides aminés libres dans des solutions synthétiques et dans des protéolysats du commerce.

Nous décrirons successivement :

- les différentes techniques utilisées ;
- les résultats obtenus dans l'étude :
 - a) d'une solution que nous avons préparée nous-même,
 - b) d'une solution commercialisée,
 - c) de six échantillons de protéolysats injectables.

Ces derniers résultats seront suivis d'une discussion sur la composition de ces préparations.

Enfin, nous comparerons les résultats obtenus avec la méthode physicochimique automatisée et avec deux méthodes microbiologiques :

- . la méthode d'ADRIAN (I)
- . la méthode de LELUC (I8)

et nous indiquerons les renseignements que l'on peut tirer de ces différentes techniques de dosage.

CHAPITRE I

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Nous rappellerons, tout d'abord rapidement, les méthodes chimiques classiques que nous avons utilisées, puis nous décrirons, en détail, la technique utilisant l'autoanalyseur pour le dosage des acides aminés.

a) - Méthodes chimiques classiques :

- Méthode de KJELDAHL pour la détermination de l'azote total : selon la technique décrite dans la Pharmacopée française (p. 1533), la minéralisation est faite en présence d'acide sulfurique, de sulfate de potassium et d'un catalyseur. (1)
Après entraînement par la vapeur d'eau, le distillat est titré par l'acide sulfurique en présence de l'indicateur rouge de méthyl-bl ou de méthylène.
- Méthode de SØRENSEN pour la détermination de l'azote α -aminé : selon la technique décrite dans la Pharmacopée américaine U.S.P. XVIII pour les protéolysats, les mesures de pH étant faites au potentiomètre.
- Dosage de l'ammoniac : Après entraînement à la vapeur d'eau en présence d'alcool, l'ammoniac recueilli dans un excès d'acide chlorhydrique est dosé en retour en présence de rouge de méthyl-bleu de méthylène comme indicateur.

b) Dosage des acides aminés par la méthode physico-chimique automatisée.

Ce dosage a été fait à l'aide d'un analyseur automatique TECHINICON.

Le principe est le suivant :

(1) Catalyseur Prolabo.

Les acides aminés, séparés par chromatographie sur colonne de résine cationique (chromobeads Technicon, type A), sont élués par passage d'un flux de tampon provenant d'un autograde à neuf chambres, qui permet de donner à cet éluat un pH déterminé au départ et qui varie suivant un gradient continu de pH et de force ionique, pendant les vingt deux heures que dure l'élution. A la sortie de la colonne une partie des effluents est prélevée par une pompe proportionnante, dirigée vers un bain-marie, puis vers deux colorimètres connectés à un enregistreur par points à deux canaux.

La mise en évidence des acides aminés est basée sur la réaction de Moore et Stein. Grâce à la pompe proportionnante, l'éluat est mélangé dans des proportions constantes au réactif à la ninhydrine. Le mélange, fractionné en parties aliquotes par des bulles d'azote, séjourne seize minutes dans un bain-marie à 95° C qui permet le développement complet de la coloration, dont l'intensité est ensuite mesurée par deux colorimètres (permettant la lecture à deux longueurs d'onde 570 et 440 nm ; cette dernière augmentant la sensibilité de la lecture dans le cas de la proline et de l'oxyproline).

Par un dispositif photométrique d'enregistrement automatique, la courbe des coefficients d'extinction peut être tracée d'une manière continue.

Le chromatogramme enregistré présente un certain nombre de pics correspondant chacun à un acide aminé donné. La surface de chaque pic est proportionnelle à la concentration de l'acide aminé correspondant dans l'éluat. Par l'étude préalable d'une solution étalon, l'autoanalyseur permet la comparaison des effluents à analyser à des effluents connus. A l'occasion de chaque essai, un étalon interne est introduit dans le prélèvement de l'échantillon à analyser et permet un contrôle du bon fonctionnement de chacun des éléments de l'appareil : la norleucine a été choisie pour jouer ce rôle en raison de sa réaction positive avec la ninhydrine et de son absence dans les protéines naturelles.

Réactifs utilisés

Les tampons sont préparés comme suit :

- Tampon pH 2,87

Citrate de sodium 5,5 OH2	17,83 g
Soude 2 N	25 ml
brij 35 sol. à 30 %	10 ml
acide octanoïque	1 ml
thiodiglycol	5 ml
acide chlorhydrique 6 N	Q.S.P pH 2,87
eau permutée	Q.S.P. 1 litre.

- Tampon pH 3,8

même composition que le précédent avec
ClH 6 N Q.S.P. pH 3,8

- Tampon pH 5,0

Citrate de sodium 5,5OH2	17,83 g
Chlorure de sodium	35,07 g
Soude 2 N	25 ml
Brij 35 sol. à 30 %	10 ml
acide octanoïque	1 ml
acide chlorhydrique 6 N	Q.S.P. pH 5,0
eau permutée	Q.S.P. 1 Litre.

Le gradient de solution tampon que nous avons utilisé pour l'élution est le suivant :

<u>chambre de l'autograde</u>	<u>tampon pH 2,87</u>	<u>3,8</u>	<u>5,0</u>
I à 4	75 ml	0 ml	0 ml
5	0	70	5
6	6	9	60
7, 8 et 9	0	0	75

- Tampon acétate de sodium pH 5,5

Acétate de sodium 3 OH2	378 g
Acide acétique	100 ml
Eau permutée	Q.S.P. 1 Litre
Soude 5 N	Q.S.P. pH 5,5

- Réactif à la ninhydrine

Ninhydrine	8 g
Hydrindantine	0,60 g
Méthylcellosolve pur	260 ml
(pour dissoudre la ninhydrine puis l'hydrindantine)	
Tampon acétate de sodium pH 5,5	140 ml
Méthylcellosolve dilué à 1/2	1.600 ml

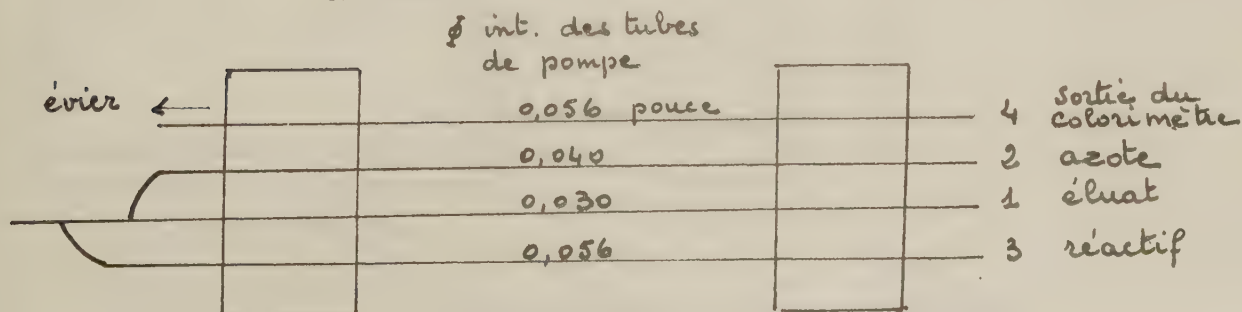
Ce réactif est préparé dans un flacon de verre coloré dans lequel de l'azote a été passé pendant 15 minutes env. pour chasser l'air. L'arrivée de gaz par le fond du flacon permet un barbotage dans le réactif pendant sa préparation et encore 15 minutes après. Ensuite l'arrivée d'azote se fait par le haut du flacon pour conserver le réactif à l'abri de l'air.

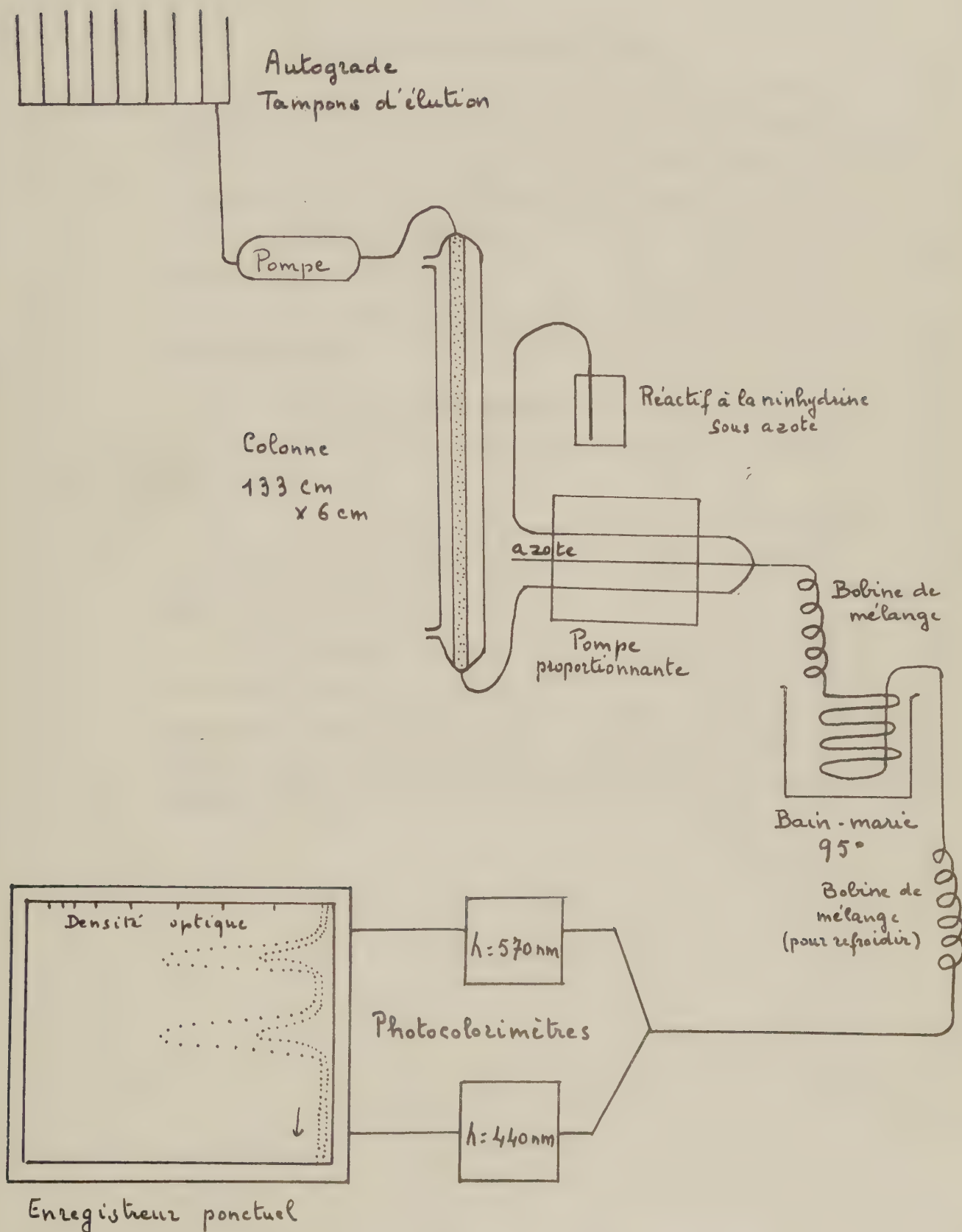
PROTOCOLE d'UN ESSAI

Le prélèvement de l'échantillon varie suivant les protéolysats ; il est de 0,25 ml d'une dilution au 1/12,5 ou au 1/5 selon les cas, c'est à dire que finalement 0,02 à 0,05 ml d'échantillon sont déposés au sommet de la colonne de résine. La dilution est faite en ajoutant la solution de norleucine, comme étalon interne et de l'acide chlorhydrique N/10 en quantité suffisante. Le pH de l'échantillon doit se trouver inférieur à pH 2,8, pH du premier tampon d'élution.

L'échantillon déposé sur la résine est poussé par de l'azote (800 à 900 grammes de pression), le haut de la colonne rincé avec 0,25 ml de tampon pH 2,8 puis rempli avec ce même tampon. L'élution commence alors automatiquement. Le bas de la colonne est relié à l'appareil analytique automatique.

Le manifold utilisé est préparé suivant le schéma ci-contre :





Il comporte quatre tubes de pompe :

- le premier (diamètre int. 0,030 pouce) amène l'éluat de chromatographie à partir du bas de la colonne.
- le second (diam. int. 0,040 pouce) permet l'arrivée de l'azote qui fragmente le prélèvement d'éluat.
- le troisième (diam. int. 0,056 pouce) apporte le réactif à la ninhydrine,
- le quatrième (diam. int. 0,056 pouce) pompe le liquide à la sortie du colorimètre pour l'envoyer vers l'évier.

Ces deux derniers tubes sont en "solvaflex", matière résistante au méthylcellosolve, alors que les autres sont en "C.R.V. Tygon".

La pompe proportionnante est mise en route avant le début de l'élution, afin de régler la ligne de base en passant du réactif et du tampon 2,8.

L'élution est poursuivie pendant 21 H. 30 jusqu'au passage de l'arginine, à raison de 30 ml par heure. La résine est ensuite régénérée par passage de soude 0,2 N pendant 30 minutes, puis remise en tampon 2,8 par passage de celui-ci pendant 2 heures. La résine est alors prête pour un nouvel essai.

INTERPRETATION des résultats

Pour interpréter les résultats, il est nécessaire de savoir :

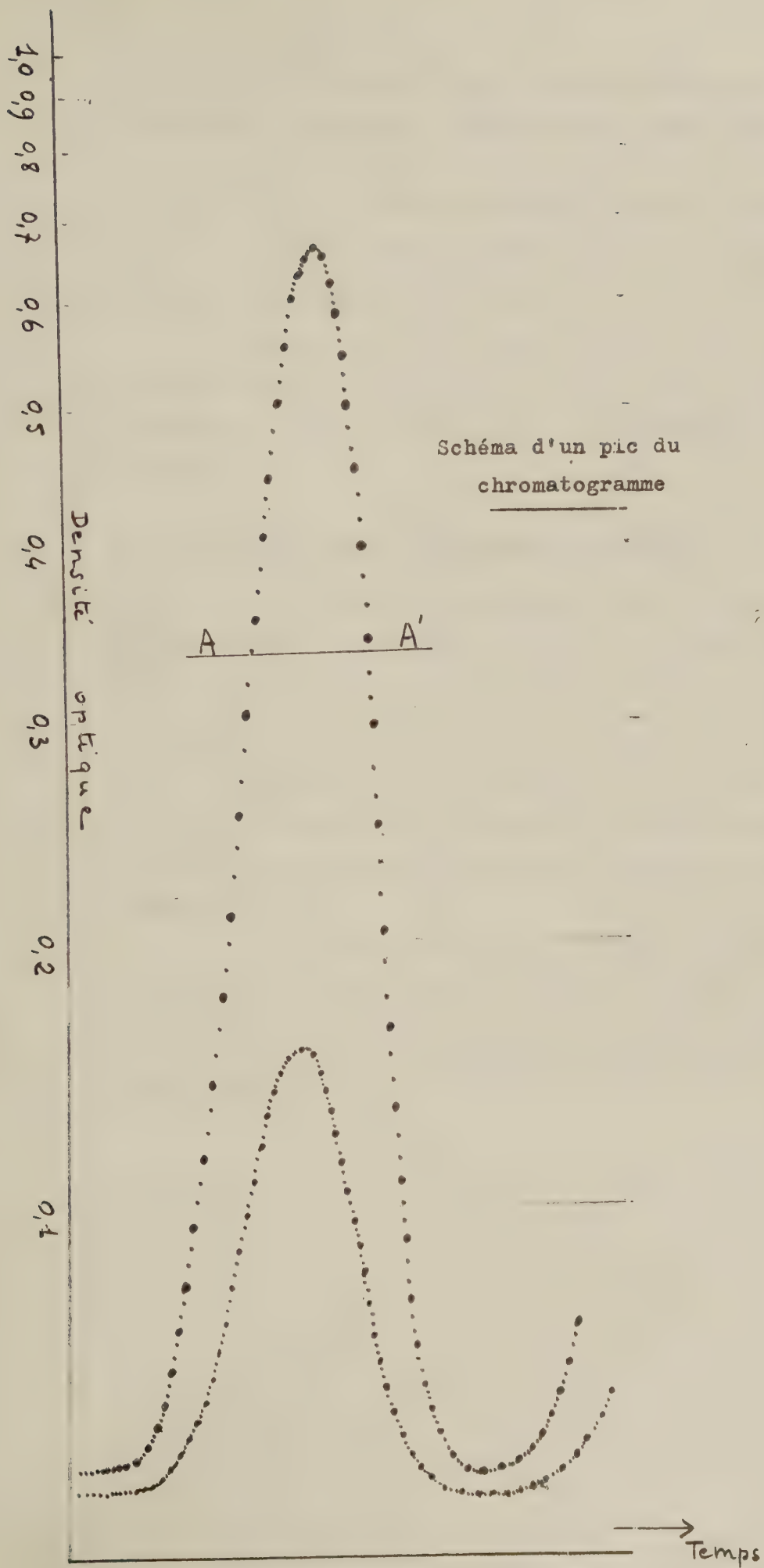
- calculer la surface d'un pic du chromatogramme
- déterminer le coefficient de coloration de chaque acide aminé,
- en déduire la teneur en acides aminés d'un échantillon.

Abordons successivement chacune de ces phases :

a) Calcul de la surface d'un pic

La surface du pic obtenu étant proportionnelle à la quantité d'acide aminé dans l'échantillon, il est nécessaire de calculer cette valeur.

La valeur de la surface peut être exprimée en termes arbitraires si la surface qui lui est comparée est exprimée dans les mêmes termes. Cette surface correspond au produit de la hauteur du pic par la largeur à la mi-hauteur. La mesure de la hauteur est suffisamment précise en l'exprimant en densité optique (sans oublier de déduire la hauteur de la ligne de base $H = H_t - B$). La largeur W , prise à la mi-hauteur $1/2 H + B$, est par contre difficile à mesurer avec précision ; en pratique on l'exprime en nombre de points comptés au-dessus de la ligne de mi-hauteur. En effet, on utilise un enregistreur ponctuel (un point toutes les 12 secondes), l'écart entre chaque point (mesuré par projection sur l'abscisse temps) est donc toujours identique à lui-même. Le nombre de points comptés au-dessus de la ligne de mi-hauteur moins un, représente donc la largeur W , dans le cas où les deux points symétriques (A et A' sur le schéma) se trouvent sur la ligne de demi-hauteur. Dans le cas contraire on apprécie la distance des deux points A et A'



à la ligne de mi-hauteur, ce qui permet de déterminer la fraction à ajouter pour obtenir W avec exactitude.

$w = \text{Nb de Pts} - I + \text{éventuellement } I \text{ fraction de point.}$

Dans l'exemple ci-joint : de A à A' 50 points.

$$W = 50 - I + 0,4 = 49,4$$

L'enregistreur à points imprime un point de couleur différente tous les trois points, ce qui permet de les compter plus facilement dans la zone du pic où ceux-ci sont très rapprochés.

b) Détermination des coefficients de coloration.

Par passage d'une solution étalon d'acides aminés, les coefficients de coloration sont déterminés pour chaque acide aminé. Le coefficient de coloration K est une valeur proportionnelle à la surface du pic obtenu et rapportée à une micromole. En pratique, on chromatographie une solution étalon contenant 0,2 micromole de chaque acide aminé, puis on calcule la surface du pic ; on multiplie par 5 chaque résultat de façon à obtenir la surface correspondant à une micromole.

Les coefficients ainsi déterminés en faisant la moyenne des résultats obtenus au cours de 15 essais se trouvent dans le tableau N° I, ainsi que le poids moléculaire de chaque acide aminé et la quantité d'azote se trouvant dans chacun d'eux.

TABLEAU n° I

COEFFICIENTS DE COLORATION et POIDS MOLECULAIRES
des ACIDES AMINES

	<u>K</u>	<u>PM.</u>	<u>% d'azote</u>
Ac. cystéique	79,4	169,2	8,28
Ac. aspartique	85,7	133,1	10,52
Thréonine	84,5	119,1	11,75
Sérine	92,2	105,1	13,33
Ac. glutamique	88,2	147,0	9,52
Proline	17,9	115,1	12,16
Glycine	95,4	75,1	18,64
Alanine	83,7	89,1	15,71
valine	82,9	117,1	11,95
Cystéine	43,1	121,0	11,57
Méthionine	84,7	149,2	9,38
Isoleucine	84,5	131,2	10,67
Leucine	90,4	131,2	10,67
Norleucine	84,2	131,2	10,67
Tyrosine	83,8	181,2	7,73
Phénylalanine	81,2	165,2	8,47
Ornithine 2 ClH	106,5	205,1	13,65
Lysine ClH	101,0	182,7	15,32
Tryptophane	66,5	204,9	13,71
Histidine ClH	92,3	209,6	20,03
Arginine ClH	89,0	210,7	26,57

c) Calcul de la teneur en acides aminés en grammes par litre.

La présence de la norleucine ajoutée à l'échantillon comme étalon interne permet de tenir compte des conditions expérimentales de chaque essai en calculant un coefficient de correction. Ce coefficient est défini par le rapport K théorique norleucine (84,2) sur la valeur déterminée pour la norleucine dans l'essai donné. Ce coefficient de correction voisin de 1 est appliqué à la surface du pic de chaque acide aminé.

Surface corrigée = surface mesurée x coefficient de correction.

Cette surface corrigée est ensuite extrapolée à 1 ml de solution d'après la prise d'essai utilisée, et la valeur obtenue est divisée par le coefficient propre à chaque acide aminé.

La concentration ainsi obtenue est exprimée en micromoles par millilitre; elle est ensuite convertie en grammes par litre en tenant compte du poids moléculaire.

En résumé :

Hauteur du pic	= H total - Base
Surface du pic	= H x W
	W étant = nbre de points au-dessus de la ligne de mi-hauteur.
Surface corrigée	= H x W x coef. de correction
Surface rapportée à 1 ml	= S corrigée x $\frac{1}{X}$ = K'
	X étant = à la prise d'essai en ml.
Concentration en micromoles / ml	= $\frac{K'}{K} = c$
Concentration en g/l	= $\frac{c \times PM}{1.000}$ PM = poids Moléculaire.

EXEMPLE :

Cas de l'acide aspartique dans le tableau n° 2

Hauteur du pic

$$H = H_t - B = 0,660 - 0,023 = 0,637$$

mi-hauteur

$$= 1/2 H + B = \frac{0,637}{2} + 0,023 = 0,341,$$

$$\text{Nombre de points à la mi-hauteur} = 49,4$$

Surface du pic

$$H \times W \quad 0,637 \times 49,4 = 31,46$$

Le coefficient de correction calculé avec la norleucine, étant $\frac{84,2}{89,9} = 0,94,$

la surface corrigée est égale à :

$$31,46 \times 0,94 = 29,57$$

le volume de prélèvement étant égal à 0,02 ml d'échantillon (0,20 ml d'une dilution au 1/10) $\frac{I}{X} = 50$

$$\text{d'où } K' = 29,57 \times 50 = 1478,5$$

Le rapport $\frac{K'}{K}$ indiquant la concentration en micromoles

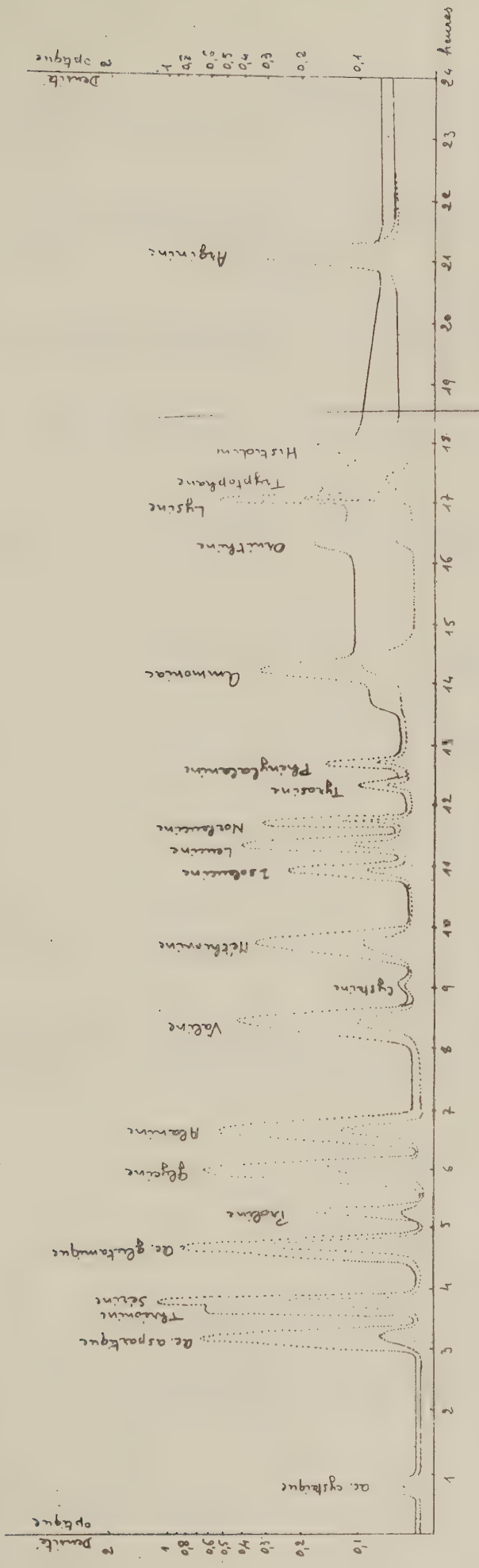
$$\text{est égal à : } \frac{1478,5}{85,7} = 17,25$$

(85,7 est le coefficient K de l'acide aspartique d'après le tableau I),

en grammes par litre :

$$\frac{17,25 \times PM}{1.000} = \frac{17,25 \times 133,1}{1.000} = 2,29 \text{ g/l.}$$

Nous donnons dans le tableau n° 2 l'interprétation complète d'un chromatogramme (ci-joint).



EXEMPLE de CALCULS EFFECTUES sur un CHROMATOGRAMME

	B	Ht	H	I/2 H + B	W	HxW	S corrigé	K' x 50	K' K	I c/l
Ac. cystéique	0,020	0,070	0,050	0,045	30,8	1,54	1,45	72,5	0,91	0,15
Ac. aspartique	0,023	0,660	0,637	0,341	49,4	31,46	29,57	1478,5	17,25	2,29
Thréonine	0,024	0,620	0,596	0,322	59,2	35,27	33,16	1658,	19,62	2,33
Sérine	0,024	1,050	1,026	0,537	57,9	59,45	55,89	2794,5	30,60	3,18
Ac. glutamique	0,028	0,839	0,811	0,433	73	59,20	55,65	2782,5	28,08	4,63
Proline	0,018	0,184	0,16	0,101	76,5	12,70	11,94	597	33,35	3,83
Glycine.	0,031	0,662	0,631	0,346	77,2	48,71	45,78	2289,	23,99	1,80
Alanine	0,032	0,539	0,507	0,285	86,8	44,	41,36	2068	24,7	2,20
Valine	0,032	0,440	0,408	0,236	98	39,98	37,58	1879	22,66	2,65
Cystéine	0,034	0,039	0,005	0,054	62	0,31	0,29	14,8	0,34	0,41
Méthionine	0,034	0,358	0,324	0,196	83	26,89	25,27	1263,5	13,86	2,06
Isoleucine	0,036	0,238	0,202	0,137	67	13,53	12,72	636	7,52	0,98
Leucine	0,037	0,422	0,385	0,229	68	26,18	24,60	1230	13,10	1,78
Norleucine	0,040	0,310	0,270	0,175	66,6	17,98	x 5 =	89,9	84,2/89,9	= cof. 0,94
Tyrosine	0,041	0,101	0,050	0,071	67	4,02	3,78	189	2,25	0,41
Phénylalanine	0,042	0,156	0,114	0,099	64,5	7,35	6,91	345,5	4,67	1,77
Ornithine 2 ClH	0,116	0,178	0,062	0,147	66	4,09	3,84	192	1,80	0,37
Lysine ClH	0,113	0,522	0,409	0,317	62	25,36	23,83	1191,5	11,80	2,15
Tryptophane	0,110	0,172	0,062	0,141	102	6,32	5,94	297	4,46	0,91
Histidine ClH	0,100	0,178	0,078	0,139	78	6,08	5,71	285,5	3,09	0,64
Arginine ClH	0,076	0,420	0,344	0,248	105,	36,12	33,95	1697,5	19,07	4,02

* Prise d'essai 0,02 ml $\frac{I}{0,02} = 50$

Certaines précautions permettent d'augmenter la sensibilité du dosage :

- le réactif à la ninhydrine étant conservé sous azote permet d'éviter la perte de sensibilité qui serait due à une oxydation, même partielle du réactif,
- l'azote utilisé est purifié par passage dans une solution de pyrogallol et dans de l'acide sulfurique,
- la contamination des tampons d'élution par l'ammoniac atmosphérique qui pourrait faire varier la ligne de base à partir de la sortie de l'ammoniaque, en formant un plateau persistant un peu avant et longtemps après le pic véritable de l'ammoniaque, peut être évitée :
 - . en utilisant une eau très purifiée (par passage sur résine SAGEI)
 - . en introduisant de l'azote en permanence dans l'atmosphère de l'autograde au-dessus des tampons.

L'utilisation d'étalons internes permet d'augmenter la précision de la technique, la norleucine est généralement utilisée parce qu'elle sort à peu près au milieu du chromatogramme, on peut ajouter deux autres étalons internes : la taurine qui sort au début du chromatogramme et l'acide 2 amino 3 guanidino-propionique qui apparaît à peu près à mi-distance entre l'histidine et l'arginine.

CHAPITRE II

ETUDE DE DEUX SOLUTIONS d'ACIDES AMINES

Afin d'éprouver la valeur de cette technique et de comparer les résultats obtenus avec ceux que donnent les méthodes chimiques classiques, nous avons préparé une solution d'acides aminés dont la composition correspond approximativement à la composition moyenne trouvée dans les protéolysats du commerce. Il a paru intéressant de savoir si, dans des proportions assez variables d'un acide aminé à l'autre, la sensibilité obtenue était bonne. Le tableau n° 3 indique, d'une part la composition théorique de la solution en grammes par litre pour chaque acide aminé, avec la teneur correspondante en azote en grammes, d'autre part la composition établie avec l'autoanalyseur (moyenne de 8 essais) et la valeur en azote déduite de ces résultats.

Pour chaque acide aminé, nous avons calculé la différence entre le résultat obtenu avec l'autoanalyseur et la quantité réelle (en considérant comme négligeable l'erreur de pesée) introduite dans la solution et nous en avons déduit le pourcentage d'erreur qui est indiqué dans le tableau n° 3 pour chaque acide aminé.

Les valeurs obtenues montrent que dans huit cas sur dix-huit, l'erreur est inférieure à 3 % ; dans sept cas, elle est comprise entre 3 et 5 % et dans trois cas elle est située entre 5 et 6 %.

TABLEAU N° 3

COMPOSITION de la SOLUTION EXTEMPORANÉE d'ACIDES AMINES
en GRAMMES PAR LITRE

	THEORIQUE		AUTOANALYSEUR		x % d'erreur.
	Acides aminés	N	Acides aminés	N	
Ac. aspartique	1,30	0,136760	1,22	0,128344	6
Thréonine	1,29	0,151575	1,26	0,148050	2,3
Sérine	1,59	0,211947	1,58	0,210614	0,6
Ac. glutamique	2,29	0,218008	2,17	0,206584	5
Proline	1,78	0,216448	1,88	0,228608	5
Glycine	0,90	0,167760	0,84	0,156576	6
Alanine	1,08	0,169668	1,06	0,166526	1,8
Valine	1,09	0,130255	1,04	0,124280	4,5
Cystéine $\text{ClH}, 2 \text{ OH}_2$	0,20	0,016360	0,20	0,016360	0
Méthionine	1,00	0,093800	0,95	0,089100	5
Isoleucine	0,49	0,052283	0,47	0,050149	4
Leucine	0,79	0,084293	0,75	0,080025	5
Tyrosine	0,20	0,015460	0,20	0,015460	0
Phénylalanine	0,49	0,041503	0,52	0,044044	2
Lysine ClH	0,80	0,122560	0,83	0,127156	3,7
Histidine ClH	0,30	0,060090	0,29	0,058087	3
Tryptophane	0,49	0,066279	0,50	0,068550	2
Arginine 2 OH_2	1,79	0,476856	1,69	0,450216	5,5
N total		2,431905		2,368729	2,5

x Moyenne de 8 essais.

Les dosages de l'azote total par la méthode de KJELDAHL et de l'azote α -aminé par la méthode de SØRENSEN ont été effectués sur cette solution. Dans le tableau n° 4 sont indiqués les résultats obtenus, comparativement à ceux établis par calcul à partir des déterminations faites avec l'analyseur automatique.

Les résultats obtenus en utilisant l'analyseur automatique sont très voisins de la théorie (2,5 % d'erreur sur l'azote total par rapport à l'azote théorique mais seulement 1,3 % par rapport au dosage par la méthode de KJELDAHL).

TABEAU N° 4

COMPOSITION de la SOLUTION SYNTHETIQUE
d'ACIDES AMINES en GRAMMES par LITRE.

Composition théorique :			
N total	2,432	)	rapport azoté :
N α -aminé	1,943	)	0,79
Résultats par les techniques de KJELDAHL et de SØRENSEN			
N total	2,40	)	rapport azoté :
N α -aminé	1,92	)	0,80
Résultats avec l'autoanalyseur :			
N total	2,37	)	rapport azoté :
N α -aminé	1,89	)	0,79

Nous avons ensuite étudié, dans les mêmes conditions, une solution d'acides aminés synthétiques du commerce dont la composition est indiquée par le fabricant. Les résultats sont résumés dans le tableau n° 5. (il faut noter que la très forte proportion de glycine, 25 g par litre, nous a obligée à procéder à deux séries de dosages : une série sur un prélèvement de 0,02 ml d'échantillon, une autre sur 0,002 ml, celle-ci permettant la détermination quantitative de la glycine). Il apparaît que les méthodes classiques permettent d'obtenir des résultats très proches de la compo-

sition annoncée (0,1 % d'erreur sur l'azote total et 0,6 % sur l'azote α -aminé), et qu'avec l'autoanalyseur les résultats, s'ils sont très légèrement inférieurs, ne diffèrent que de 3 % environ par rapport aux chiffres théoriques).

TABLEAU n° 5

COMPOSITION d'une SOLUTION d'ACIDES AMINES
SYNTHETIQUES du COMMERCE en GRAMMES par LITRE

	Composition annoncée	Trouvée avec l'autoanalyseur
Thréonine	1,35	1,32
Glycine	25	23,98
Valine	1,85	1,78
Méthionine	2,20	2,26
Isoleucine (3)	1,35	1,31
Leucine	2,15	2,15
Phénylalanine	1,85	2,02
Lysine ClH	3,34	3,18
Tryptophane	0,80	0,77
Arginine ClH	1	0,95
Par calcul d'après la composition annoncée :		
N total	6,66	
N α -aminé	6,15	rapport azoté 0,92
Résultats par les techniques de Kjeldahl et de Sorensen :		
N total	6,65	
N α -aminé	6,11	rapport azoté 0,92
Résultats calculés d'après l'autoanalyseur		
N total	6,43	
N α -aminé	5,95	rapport azoté 0,92

(3) - L'isoleucine se décompose en deux pics correspondant aux deux isomères (isoleucine et alloisoleucine) en proportions identiques.

CHAPITRE III

ETUDE des PROTEOLYSATS

Les résultats obtenus avec des solutions de composition connue nous paraissant satisfaisants, nous avons abordé l'étude des protéolysats.

Nous commencerons par donner le détail des résultats de cinq dosages effectués sur un même échantillon avec l'autoanalyseur.

Nous indiquerons ensuite les résultats obtenus avec six protéolysats prélevés parmi les préparations commercialisées par différents laboratoires.

Enfin, nous verrons les renseignements que l'on peut tirer de ces résultats.

ETUDE d'UN ECHANTILLON

Nous avons effectué cinq dosages pour un même échantillon, ce qui nous a donné cinq valeurs pour chaque acide aminé. Nous indiquons dans le tableau n° 6 l'ensemble de ces résultats, puis la moyenne effectuée avec ces cinq déterminations. Afin de nous rendre compte de la validité de ce résultat moyen, obtenu avec cinq déterminations, nous avons calculé, pour chaque acide aminé, un coefficient de variation qui est évalué comme suit :

La variance ou quotient de la somme des carrés des écarts à la moyenne par le nombre de degrés de liberté (nombre de déterminations moins une) est donnée par la formule :

$$V = s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

L'écart type $s = \sqrt{V}$ sert à calculer le coefficient de variation

$$CV = \frac{100 s}{\bar{x}}$$

Prenons un exemple :

Les cinq dosages de l'acide aspartique ont donné les cinq valeurs suivantes :

2,27 2,24 2,23 2,29 et 2,27

dont la moyenne est : 2,26

Calculons l'écart type de chaque valeur avec la moyenne $x - \bar{x}$ et le carré de cet écart (afin de n'avoir que des valeurs positives)

x^*	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
227	+ 1	1
224	- 2	4
223	- 3	9
229	+ 3	9
227	+ 1	1
$\bar{x} = 226$		<u>24</u>

* x peut être multiplié par 100, ce qui ne change rien aux écarts.

$$\text{La variance } V = s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{24}{5 - 1} = 6$$

$$s = \sqrt{6} = 2,45$$

$$CV = \frac{100 s}{\bar{x}} = \frac{100 \times 2,45}{226} = 1,08 \%$$

Les coefficients de variation sont indiqués dans le tableau n° 6 pour chaque acide aminé. Pour dix acides aminés sur les vingt dosés, ces coefficients sont égaux ou inférieurs à 3 %, pour cinq acides aminés, ils se trouvent situés entre 3 et 5 %. Enfin, dans le cas de cinq acides aminés les valeurs du coefficient de variation sont plus élevées :

6 pour la **cystéine** et la **phénylalanine**

7 pour la **tyrosine**

8 pour l'**acide cystéique**

10 pour l'**ornithine**.

Dans le cas de la cystéine, de la tyrosine, de l'acide cystéique et de l'ornithine, ce coefficient élevé s'explique par le fait que ces acides aminés se trouvent en petite quantité par rapport à la quantité des autres acides aminés. De ce fait les pics obtenus sont très peu importants et la précision du calcul est nettement moins bonne que pour les autres pics. Afin d'avoir une précision plus grande, nous avons été amenée, dans le cas de certains échantillons, à effectuer deux séries de dosages avec des prélèvements de volumes différents.

Il faut signaler, d'autre part, que le cas de l'ornithine est un peu particulier. Il n'est certainement pas toujours préformé dans les préparations mais peut apparaître à partir de l'arginine au cours même du dosage et en quantités variables d'une fois à l'autre. Il y a toujours très peu de cet acide aminé dans les préparations que nous avons étudiées.

TABLEAU N° 6

COMPOSITION du PROTEOLYSAT en GRAMMES par LITRE

Essai n°	1	2	3	4	5	Moyenne	CV.
Ac. cystéique	0,13	0,14	0,16	0,15	0,14	0,14	8
Ac. aspartique	2,27	2,24	2,23	2,29	2,27	2,26	1,08
Thréonine	2,36	2,33	2,30	2,33	2,33	2,33	0,9
Sérine	3,26	3,18	3,20	3,18	3,28	3,22	1,4
Ac. glutamique	4,64	4,55	4,65	4,63	4,72	4,64	1,3
Proline	3,87	3,88	3,93	3,83	3,89	3,88	1,9
Glycine	1,81	1,91	1,78	1,80	1,77	1,81	3
Alanine	2,19	2,72 [⊠]	2,25	2,20	2,18	2,20	1,5
Valine	2,40	2,42	2,41	2,65	2,37	2,45	4,6
Cystéine	0,040	0,038	0,037	0,041	0,043	0,04	6
Méthionine	2,00	1,99	1,89	2,06	2,07	2,00	3,6
Isoleucine	1,21	1,02	1,01	0,98	0,97	1,04	2
Leucine	1,89	1,79	1,68	1,78	1,67	1,76	5
Tyrosine	0,48	0,46	0,40	0,41	0,44	0,44	7
Phénylalanine	0,83	0,87	0,79	0,77	0,74	0,80	6,3
Ornithine 2 ClH	0,35	0,40	0,32	0,37	0,30	0,35	10
Lysine ClH	2,24	2,23	2,32	2,15	2,20	2,23	2,7
Tryptophane	0,91	0,95	0,95	0,91	1,02	0,95	4,7
Histidine ClH	0,64	0,71	0,67	0,64	0,65	0,66	4,5
Arginine ClH	4,05	4,17	4,16	4,02	4,11	4,10	1,6

⊠ Ce chiffre, considéré comme aberrant a été éliminé.

ETUDE DE SIX PROTEOLYSATS COMMERCIALISES

Nous avons effectué sur six échantillons de protéolysats, prélevés au hasard parmi les préparations commercialisées, des dosages dont les résultats sont groupés dans le tableau n° 7.

1° - Nous avons effectué le dosage des acides aminés libres avec l'analyseur automatique. Les résultats du tableau (correspondant à la moyenne de cinq dosages au moins par échantillon) sont exprimés en grammes d'acide aminé par litre de protéolysat.

2° - Le taux d'ammoniac a été déterminé par la méthode décrite plus haut, car nous avons eu quelques variations dans la détermination quantitative de ce corps avec l'autoanalyseur, de petites quantités d'ammoniac pouvant contaminer les solutions tampons utilisées.

3° - Nous indiquons ensuite dans ce tableau, la quantité d'azote correspondant à la somme des taux de chaque acide aminé dosé par l'autoanalyseur et de l'ammoniac, en grammes d'azote par litre de protéolysat. Ces chiffres sont donc obtenus par calcul (dont nous n'avons pas rapporté le détail ici) ; de même l'azote α -aminé correspondant aux acides aminés libres et à l'ammoniac. Ces chiffres nous ont permis de calculer le rapport :

$$\frac{\text{N } \alpha\text{-aminé (A. a) + N de NH}_3}{\text{N total (A. a + NH}_3)}$$

4° - Viennent ensuite les résultats obtenus par les méthodes classiques : dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl, dosage de l'azote α aminé par la méthode de SÖRENSEN et rapport :

$$\frac{N \alpha\text{-aminé}}{N \text{ total,}}$$

calculé à partir de ces valeurs .

TABLEAU n° 7

COMPOSITION de SIX PROTEOLYSATS du COMMERCE en Grammes par Litre

	I	II	III	IV	V	VI
Ac. cystéique	0,057	0,62	0	0	0,12	0,14
Ac. aspartique	0,69	0,80	1,03	1,28	1,94	2,26
Thréonine	0,94	1,82	0,65	1,06	1,36	2,33
Sérine	1,02	1,76	1,01	0,95	1,64	3,22
Acide glutamique	1,34	3,34	1,80	0,31	6,33	4,64
Proline	1,85	1,70	1,96	0,45	3,85	3,88
Glycine	0,28	0,46	0,38	0,23	2	1,81
Alanine	0,80	1,15	0,71	1,37	1,09	2,20
Valine	1,36	2,21	0,63	1,37	1,40	2,45
Cystéine	0	traces	0	0	0	0
Méthionine	0,66	1,14	0,38	0,51	0,45	2,24
Isoleucine	1,05	1,78	0,45	1,48	1,06	1,04
Leucine	2,58	3,70	1,43	3,58	2,60	1,76
Tyrosine	0,06	0,33	0,16	0,19	0,14	0,44
Phénylalanine	1,42	1,79	0,47	0,93	0,47	0,79
Ornithine 2 ClH	0,034	0,045	0,06	0	0,024	0,35
Lysine ClH	2,19	3,92	1,46	2,92	1,64	2,23
Histidine ClH	0,53	1,27	0,50	0,50	0,68	0,66
Tryptophane	traces	traces	0,38	0,38	0	0,95
Arginine ClH	0,97	1,78	0,60	0,95	traces	4,10
NH ₃	0,29	0,50	0,48	0,306	0,06	0,27
N total (A.a + NH ₃)	2,53	4,25	2,21	2,68	3,32	5,40
N aminé (A.a) + N de NH ₃	2,09	3,42	1,88	2,17	3,09	4,22
Rapport	0,82	0,80	0,85	0,80	0,93	0,78
N total Kjeldahl	4,10	6,60	3,72	5,45	3,66	5,91
N aminé Sørensen	2,45	4,14	2,43	3,03	3,20	4,24
Rapport	0,59	0,62	0,65	0,55	0,87	0,71

DISCUSSION des RESULTATS

L'examen du tableau n° 7 nous amène à faire plusieurs remarques :

1° SUR LA TENEUR EN CHAQUE ACIDE AMINE : Le tableau n° 7 montre que la composition des protéolysats en acides aminés libres est très variable d'un échantillon à l'autre. Parmi les acides aminés essentiels, il faut remarquer que trois seulement des six échantillons renferment du tryptophane en quantités appréciables, le n° VI étant nettement le plus riche. Le taux de l'arginine varie de quelques traces à 4,10 g/l, celui de la lysine de 1,46 à 3,92 ; celui de la leucine de 1,43 à 3,70 ; celui de la thréonine de 0,65 à 2,33 ; celui de la méthionine de 0,38 à 2,24 ; celui de la valine de 0,63 à 2,45 g/l, etc...

Mais, en dehors des acides aminés considérés comme essentiels, il faut remarquer des différences de titre de 0,45 à 3,88 dans le cas de la proline, de 0,95 à 3,22 dans le cas de la sérine, de 0,31 à 6,33 dans le cas de l'acide glutamique, etc...

Notons que les échantillons I, III et IV montrent en général des teneurs en acides aminés libres plus faibles que les échantillons II, V et VI.

2° SUR LA TENEUR EN AZOTE CORRESPONDANT A CES ACIDES AMINES ; Ces résultats, obtenus avec l'autoanalyseur, ont permis de calculer la quantité totale d'azote apportée par les acides aminés ; nous y avons ajouté la quantité d'azote correspondant à l'ammoniac dosé comme nous l'avons dit plus haut. L'examen de ces chiffres montre la très grande différence qui existe entre les six protéolysats étudiés. La quantité d'azote varie de 2,21 g/l pour l'échantillon n° III à 5,40 g/l pour l'échantillon n° VI. Ceci peut certainement être considéré comme un renseignement très précieux car il s'agit de l'azote apporté par l'ensemble des acides aminés libres, donc directement disponible pour l'organisme.

3° SUR LE RAPPORT AZOTE

$$\frac{N \alpha \text{ aminé (A.a.)} + N \text{ de } NH_3}{N \text{ total (A.a.} + NH_3)}$$

ETABLI AVEC LES DONNEES de l'ANALYSEUR AUTOMATIQUE :

Ce rapport indique essentiellement la proportion d'acides polyaminés basiques ; il tend vers 1 lorsque la quantité de ces corps diminue dans la préparation ; ce qui ne paraît pas souhaitable puisqu'ils font partie des acides aminés considérés comme essentiels. Dans le cas présent, ce rapport varie de 0,78 à 0,93 ; ce qui ne signifie nullement que l'échantillon n° VI (rapport 0,78) soit moins nutritif que l'échantillon n° V : (rapport 0,93) puisqu'en effet ce dernier se montre très pauvre en arginine et dépourvu de tryptophane, alors que l'échantillon n° VI renferme une quantité notable de ces deux corps. Le rapport, ainsi calculé, ne peut donc pas servir, à lui seul, de critère de la qualité d'un protéolysat ; il est nécessaire de connaître également la composition en chaque acide aminé.

4° SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR LES METHODES CHIMIQUES CLASSIQUES : Les protéolysats examinés semblent pouvoir être classés en deux groupes : ceux qui sont les plus riches en azote total déterminé par la méthode de Kjeldahl, dont le taux varie de 5,4 à 6,6 g/l (échantillons II, IV et VI) et ceux, beaucoup plus pauvres dont le taux d'azote total se situe autour de 3,5 à 4 g/l (échantillons I, III et V). D'autre part, il faut remarquer que le rapport azoté calculé avec ces données :

$$\frac{N \alpha \text{ aminé SORENSEN}}{N \text{ total Kjeldahl,}}$$

s'il est toujours au-dessus de 0,50 comme le prescrivent la note II6 de PRO PHARMACOPOEA et la Pharmacopée américaine, est très variable d'un échantillon à l'autre (de 0,55 pour l'échantillon n° IV à 0,87 pour l'échantillon n° V).

Mais, il faut souligner que ce rapport est alors influencé par deux facteurs : non seulement, il dépend de la proportion d'acides polyaminés basiques, mais aussi de la présence éventuelle de polypeptides ou de substances aminées non α carboxyliques. En effet, en comparant ces résultats avec ceux obtenus avec l'autoanalyseur, nous remarquons que, si pour deux échantillons (V et VI) les résultats sont très proches, pour les quatre autres (I,II,III et IV) ils sont très éloignés. La quantité d'azote total déterminée par KJELDAHL dans les échantillons V et VI est constituée uniquement ou presque par l'azote des acides aminés libres tandis que dans les autres échantillons la différence importante laisse prévoir une proportion plus ou moins grande d'autres substances azotées. Dans l'échantillon n° IV par exemple, sur 5,45 g. d'azote, 2,68 seulement se trouvent sous forme d'acides aminés libres et d'ammoniac tandis que 2,77 c'est à dire plus de 50 % se trouvent sous une autre forme.

5° SUR L'INCIDENCE de la REACTION de MAILLARD : L'écart que nous avons déjà fait remarquer entre les taux d'azote total KJELDAHL et les taux d'azote des acides aminés, déterminés par l'autoanalyseur dans le cas de quatre des échantillons examinés, nous a incitée à rechercher l'incidence de la réaction de MAILLARD sur la mise en évidence des acides aminés par l'autoanalyseur. En effet, trois de ces échantillons (I,III et IV) sont glucosés, or le glucose qui comporte un groupement pseudo-aldéhydique, entre en combinaison avec les acides aminés en donnant des produits de condensation plus ou moins bien définis, colorés, dont la valeur nutritive est discutée. (39) Le sorbitol, par contre, qui entre dans la composition d'autres protéolysats, ne donne pas cette réaction.

Nous avons préparé une solution d'acides aminés synthétiques, dont une partie a été stérilisée sans glucose et une autre partie avec 5 % de glucose. La stérilisation a été faite à 115° pendant quarante-cinq minutes, puis, pour une certaine quantité de chaque solution, une seconde fois dans les mêmes conditions. Les résultats sont résumés dans le tableau 8 et les courbes ci-contre qui montrent que, sans glucose, la stérilisation n'a qu'une très faible action sur la teneur en acides aminés dosés par l'autoanalyseur, tandis qu'en

présence de glucose, cette teneur est abaissée de 7 % après une stérilisation et de 12 % après deux stérilisations. Avec la méthode de SÖRENSEN, les différences observées sont encore plus faibles. La réaction de MAILLARD est donc évidente, mais elle n'explique pas à elle seule les écarts beaucoup plus importants observés pour certains protéolysats.

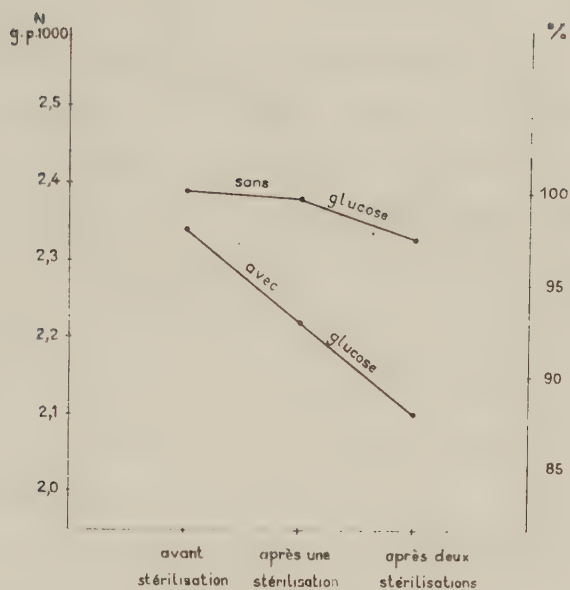
TABLEAU N° 8

INFLUENCE DU GLUCOSE SUR LA MISE EN EVIDENCE DES ACIDES AMINES
APRES STERILISATION DE LA SOLUTION (REACTION de MAILLARD) en
GRAMMES par LITRE.

CHIFFRES THEORIQUES d'APRES CALCUL :

N total 2,456 rapport 0,79
N α-aminé 1,958

	Avant stéril.	Rapport	Après une stéril.	Rapport	Après deux stéril.	Rapport
SANS GLUCOSE						
avec autoanalyseur						
N total	2,39	0,80	2,38	0,80	2,33	0,80
N α aminé	1,91		1,91		1,87	
N total Kjeldahl	2,43	0,80	2,43	0,80	2,43	0,79
N α aminé Sørensen	1,96		1,96		1,92	
AVEC GLUCOSE						
avec autoanalyseur						
N total	2,34	0,80	2,22	0,81	2,10	0,82
N α aminé	1,88		1,80		1,73	
N total Kjeldahl	2,43	0,80	2,43	0,79	2,43	0,76
N α aminé Sørensen	1,96		1,92		1,87	



INCIDENCE DE LA REACTION DE MAILLARD

6° SUR LA PRESENCE DE POLYPEPTIDES : Ayant déterminé l'incidence de la réaction de MAILLARD sur la mise en évidence des acides aminés, la seule hypothèse qui reste pour expliquer les écarts beaucoup plus forts observés pour certains échantillons entre le taux d'azote total KJELDAHL et le taux d'azote apporté par les acides aminés libres, est la présence de polypeptides. Certains fabricants font, du reste, prévoir que leur préparation renferme des polypeptides à courtes chaînes, SCHUSTER et ses collaborateurs

(36) l'ont confirmé (le terme de polypeptide demanderait du reste à être précisé, car pour certains auteurs (5), on dénomme polypeptides des peptides renfermant plus de dix molécules d'acides aminés). La proportion et même la présence de polypeptides apparaissent donc très variables d'un échantillon à l'autre. Alors qu'il n'y en a pratiquement pas dans les échantillons V et VI, il y en aurait plus de 50 % dans l'échantillon n° IV. Il est probable que les polypeptides contiennent certains acides aminés essentiels qui viennent compenser les faibles taux d'acides aminés libres et ajoutent à la valeur nutritive qui paraît assez faible dans le cas de certains échantillons. Mais l'utilisation par l'organisme des polypeptides introduits directement dans la voie sanguine est encore discutée.

De 30 à 50 % de ceux-ci seraient, chez l'homme, éliminés par l'urine, alors que la perte en amino-acides n'est que de 2,4 à 6 % (d'après CHRISTIENSEN cité par TREMOLIERES (39)). Certains gros peptides n'auraient pas cet effet alors que des molécules plus petites augmenteraient davantage l'élimination urinaire (ALLISON 2-3 ; CHRISTIENSEN, LYNCH et POWER, SMITH cités par TREMOLIERES (39)). Nous laissons l'interprétation de ces résultats à des spécialistes de la nutrition ; cependant ces remarques nous ont incitée à poursuivre l'analyse de ces préparations en étudiant la fraction peptidique afin de la mettre en évidence dans chacun des échantillons étudiés, et en la séparant de la fraction contenant les acides aminés libres que nous venons de doser.

Mais, avant d'entreprendre le compte rendu de cette partie de notre travail, nous indiquerons, pour terminer notre étude sur le dosage des acides aminés libres, les résultats obtenus avec deux méthodes microbiologiques et nous ferons une comparaison de ces résultats avec ceux obtenus avec la méthode physicochimique automatisée.

CHAPITRE IV

Nous avons utilisé deux techniques de dosage microbiologique des acides aminés : la méthode d'ADRIAN (1) et la méthode de LELUC (18).

A - DOSAGE MICROBIOLOGIQUE PAR LA METHODE D'ADRIAN.

Parmi toutes les techniques de dosage microbiologique décrites par les auteurs, nous avons choisi la méthode de J. ADRIAN (1) parce que cet auteur a essayé de standardiser au maximum la technique qui se trouve applicable aux huit acides aminés essentiels : leucine, iso-leucine, méthionine, phénylalanine, lysine, tryptophane, cystine et thréonine et même à trois autres acides aminés, arginine, histidine et valine, en faisant varier seulement la souche microbienne utilisée. L'analyse simultanée de onze acides aminés est donc réalisable.

Le principe de ce dosage microbiologique des acides aminés est de fournir au microorganisme approprié un apport énergétique, les sels minéraux, les vitamines B, tous les acides aminés non indispensables et enfin tous les acides aminés indispensables moins celui qui fait l'objet du dosage, qui devient ainsi le seul facteur limitant. Certains microorganismes croissent proportionnellement à la quantité d'un acide aminé essentiel donné, quand cet élément complète ce milieu de base. La réponse de la souche est mesurée par le titrage acidimétrique de l'acide lactique élaboré par la culture.

Technique - Préparation du milieu de culture -

1 - Partie commune :

- solution vitaminique I :

Thiamine	I mg
Riboflavine	10 mg
Biotine	0,02 mg
Acide acétique glacial	ajouté à chaud
Q.S.P.	dissoudre
Eau bidistillée ...Q.S.P..	500 ml

Stériliser 15 minutes à 120° C

- solution vitaminique II :

Pyridoxine	10 mg
Pantothénate de calcium	5 mg
Acide para-aminobenzoïque	5 mg
Niacine	15 mg
Acide folique	0,5 mg
Eau bidistillée	Q.S.P. 500 ml
Stériliser 15 minutes à 120° C.	

- solution de purines :

Adénine	200 mg
Uracile	200 mg
Guanine	200 mg
ClH à 20 % (ajouté à chaud) Q.S.P.	dissoudre
Eau bidistillée	Q.S.P. 200 ml
Stériliser 15 minutes à 120° C.	

- solution commune d'acides aminés non indispensables :

	<u>Série L</u>	<u>Série DL</u>
Acide aspartique	4 g	8 g
Acide glutamique	4	8
Alanine	1	2
Glycocolle	1	1
Hydroxyproline	1	2
Norleucine	1	2
Norvaline	1	2
Proline	1	2
Sérine	1	2
Tyrosine	1	2
Acide chlorhydrique à 20 %	ajouté à chaud	
	Q.S.P. dissoudre	
Eau bidistillée	Q.S.P.	1.000 ml
Stériliser 15 minutes à 120° C.		

- acétate de sodium

- mélange effectué à sec de glucose et d'éléments minéraux :

Glucose anhydre	1.000 g
Phosphate dipotassique (R) .	25 g
Phosphate monopotassique (R)	25 g
Sulfate de magnésium (R)....	10 g
sulfate ferreux (R)	1 g
sulfate de manganèse (R) ...	1 g
Chlorure de sodium (R)	1 g.

A la condition qu'il soit conservé à l'abri de l'humidité ce mélange est stable pendant 6 mois.

II - Partie variable, selon l'acide-amino dosé
(solutions individuelles d'acides-amino) :

	Série L	Série DL
I - Arginine	0,50 g	I g
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
2 - Cystine	0,50 g	I g
Acide chlorhydrique à 20 %	3 ml	
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
3 - Histidine	0,50 g	I g
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
4 - Isoleucine	0,50 g	I g
Acide chlorhydrique à 20 %	0,50 ml	
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
5 - Leucine	0,50 g	I g
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
6 - Lysine	0,50 g	I g
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
7 - Méthionine	0,50 g	I g
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
8 - Phénylalanine	0,50 g	I g
Acide chlorhydrique à 20 %	0,50 ml	
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
9 - Thréonine	0,50 g	I g
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
IO - Tryptophane	0,50 g	I g
Acide chlorhydrique à 20 %	2 ml	
Eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	
II - Valine	0,50 g	I g
eau bidistillée Q.S.P.	250 ml	

Toutes ces solutions, à l'exception des solutions de cystine et de tryptophane, sont stérilisées 15 minutes à 120° C.

- Composition du milieu de base : (pour 50 tubes).

Dans une fiole graduée sont mesurés les solutions et mélange de sels dans les proportions suivantes :

Solution vitaminique I	5 ml
Solution vitaminique II	5 ml
Solution de purines	5 ml
Solution commune d'acides aminés non indispensables	50 ml
Mélange conservé à sec de glucose et de sels minéraux	15 g.

Et de chaque solution d'acide aminé, figurant ci-dessus, sauf de celle de l'acide aminé titré, 25 ml soit 250 ml.

Cet ensemble est neutralisé à pH 7 exactement avec de la soude. Il est ajusté à 500 ml avec de l'eau bidistillée. Il n'est préparé qu'au moment du besoin et placé à la glacière, s'il n'est pas employé immédiatement.

L'organisme choisi par ADRIAN est Lactobacillus arabinosus I7/5 (ATCC 8014) qui permet le dosage des huit acides aminés essentiels. En utilisant Leuconostoc mesenteroides P/60 (ATCC 8042) le dosage de la valine peut être fait dans les mêmes conditions avec une grande sensibilité. Dans le cas de l'arginine et de la cystéine Streptococcus faecalis (MTCL 6459) peut être heureusement substitué au Lactobacille. Enfin, dans le cas de l'histidine, Lactobacillus mesenteroides P/60 et Streptococcus faecalis (MTCL 6459) sont utilisables.

Nous n'avons utilisé qu'une seule souche, Lactobacillus arabinosus, I7/5 dont le milieu d'entretien est le suivant :

Gélose	1,50 g
Glucose	0,50 g
Acétate de sodium	0,85 g
Extrait de levure	2 g
Eau bidistillée ..Q.S.P.	100 ml.

La souche estensemencée toutes les semaines sur le milieu. La veille du dosage, la souche estensemencée sur un des tubes de milieu de base complet et incubée 24 heures à 37°C. Au moment du dosage X gouttes de cette culture liquide bien homogénéisée sont diluées dans 10 ml de soluté chloruré physiologique. C'est cette suspension qui sert à l'ensemencement des tubes, à raison de 0,05 ml par tube.

PROTOCOLE DU DOSAGE

- Constitution de la courbe étalon : l'auteur a déterminé, selon les besoins en métabolites du Lactobacillus, la concentration à réaliser pour préparer la solution de travail de l'acide aminé étalon, de manière à ce que la répartition de cette solution se fasse toujours dans les mêmes conditions, ce qui facilite la technique.

Les concentrations de ces solutions sont les suivantes :

	<u>dilution de la solution- mère indiquée plus haut</u>	<u>Concentration de la solution étalon.</u>
Isoleucine	I/20	100 mcg/ml
Leucine	I/20	100 mcg/ml
Méthionine	I/40	50 mcg/ml
Phénylalanine	I/20	100 mcg/ml
Thréonine	I/10	200 mcg/ml
Tryptophane	I/40	50 mcg/ml
Valine	I/10	200 mcg/ml
Lysine	I/5	400 mcg/ml

Ces solutions ne sont préparées à partir des solutions mères que si celles-ci ne sont pas stérilisées au préalable, sinon, elles sont préparées extemporanément.

Avec ces solutions, la gamme étalon est préparée en répartissant dans une série de tubes :

0,05 0,10 0,15 0,20 0,25 0,30 0,35 0,40 0,45 0,50 ml
de la solution de travail.

Au cours de nos essais, nous avons préparé chaque fois trois séries pour l'étalon et trois pour le dosage, alors qu'ADRIAN ne prépare chaque série qu'en double exemplaire. De plus, il est ajouté un tube témoin sans acide aminé et un second tube témoin qui ne sera pas ensemencé et qui servira de témoin de la stérilisation.

10 ml de milieu de culture sont ajoutés dans chaque tube, le volume final variant ainsi de 10 à 10,50 ml ; cette différence n'est pas nuisible au dosage, fait qui a été confirmé par plusieurs auteurs (I- I3). Ce qui est très important c'est le volume de milieu de culture qui doit être rigoureusement le même dans tous les tubes.

Après un autoclavage de 15 minutes à 115° C et refroidissement, les tubes sont ensemencés avec 0,05 ml de la culture diluée comme il a été indiqué plus haut.

Un dosage acidimétrique est effectué après 48 heures d'incubation. L'acide lactique produit est neutralisé par une solution d'hydroxyde de sodium N/20 en présence de bleu de bromothymol.

La courbe étalon est établie en portant en abscisses les quantités d'acide aminé contenues dans les tubes ou mieux les concentrations ainsi réalisées en microgrammes par millilitre et en ordonnées les quantités de soude N/20.

- Dans le cas de la solution étudiée, une solution de travail est préparée par dilution dans des proportions qui l'amènent à une concentration qui est approximativement du même ordre de grandeur que celle de la solution étalon. Dans deux ou trois séries de 5 tubes sont mesurés :

0,05 0,10 0,20 0,30 0,40 ml
de la solution de travail, puis 10 ml de milieu de culture.

Stérilisation, ensemencement et incubation sont effectués dans les mêmes conditions que pour la courbe étalon. Cette dernière permet de calculer la concentration de la solution de travail. Les résultats sont exprimés en dérivé L. Les teneurs en dérivé DL correspondent au double des quantités précédentes.

METHODE d'INTERPRETATION STATISTIQUE

Il existe, entre deux limites données, une relation linéaire entre les réponses (quantités de solution d'hydroxyde de sodium en ml pour neutraliser l'acidité formée) et les concentrations en acide aminé. Dans ce cas, on obtient deux droites, une droite étalon et une droite échantillon, de pentes différentes se coupant en un point $X = 0$ et l'activité relative de l'échantillon par rapport à celle de l'étalon est donnée par le rapport entre les pentes :

$$R' = b_X / b_E$$

Le plus souvent cette relation linéaire s'observe aux doses les plus basses, la droite dose-réponse s'infléchissant au delà d'une dose limite.

Pour vérifier la validité de nos dosages, nous avons appliqué la méthode statistique (d'après J. PHILIPPE p. 289 (27)).

Pour cela il est nécessaire d'utiliser :

- . un même nombre de doses pour l'étalon et pour l'échantillon,
- . ces doses étant en progression arithmétique.

Nous avons donc déterminé, pour chaque dosage, d'après la courbe étalon obtenue, les concentrations de l'acide aminé permettant d'obtenir une relation linéaire. Nous avons alors réuni les données d'un dosage en 5 ou 7 points :

- I blanc correspondant au témoin sans acide aminé,
- 2 ou 3 points pour l'étalon,
- 2 ou 3 points pour l'échantillon

que nous avons interprété comme l'a indiqué J. PHILIPPE (27).

Nous avons pu ainsi :

- vérifier la validité du dosage,
- calculer le titre de l'échantillon,
- établir les limites de confiance.

Nous avons donc interprété les résultats obtenus sur un protéolysat (lot a) , dans les conditions indiquées, de deux façons :

- a) par la méthode indiquée par ADRIAN (I) par lecture directe sur la courbe étalon établie avec dix concentrations,
- b) par la méthode statistique en n'utilisant que deux ou trois de ces concentrations, afin de vérifier la validité du résultat précédemment obtenu.

Nous donnerons, pour les deux premiers dosages, dosage de la méthionine et dosage de la phénylalanine, les indications détaillées pour appliquer les méthodes statistiques : l'une utilisant deux concentrations et l'autre trois concentrations de l'acide aminé. Dans le cas des six autres dosages d'acides aminés nous n'indiquerons que les résultats obtenus :

- . examen de la validité du dosage,
- . titre calculé de l'échantillon,
- . limites de confiance

et comparaison avec les résultats obtenus par lecture directe sur la courbe étalon.

a) DOSAGE de la METHIONINE

La solution mère de l'acide aminé étalon est préparée à 50 mcg/ml ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de culture du dosage :

0,25 0,50 0,75 I I,25 I,50 I,75 2 2,25 et 2,50 mcg/ml de L méthionine.

Le protéolysat est dilué au I/20, la concentration théorique étant de I.000 mcg/ml.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Etablissement de la courbe étalon

conc. en L Méthionine en mcg/ml	Qté de solution d'hydroxyde de sodium N/20 en ml			Moyenne
0	0,40	0,40	0,40	0,40
0,25	3	2,7	2,8	2,8
0,50	5	6,2	5,2	5,45
0,75	8	7,9	8	7,95
I.	9,6	9,6	9,7	9,6
I,25	IO,6	IO,4	IO,6	IO,5
I,50	IO,7	IO,4	IO,6	IO,55
I,75	II	IO,9	IO,9	IO,9
2	II	II	II	II
2,25	IO,9	II	II,3	II,05
2,50	II,2	II,3	II,2	II,25

Ces valeurs ont servi à construire la courbe ci-jointe qui paraît utilisable au-dessous de I,25 mcg/ml.

Qté de sol. au I/20	Qté de sol.d'hydroxyde de sodium N/20 en ml moyenne				con. en L méthionine/ml
0,05 ml	3,3	3,2	3,2	3,2	0,287 mcg
0,10	6,3	5,8	5,9	6	0,562
0,20	IO,3	IO,5	IO,I	IO,3	I,I75

Concentration de l'hydrolysate :

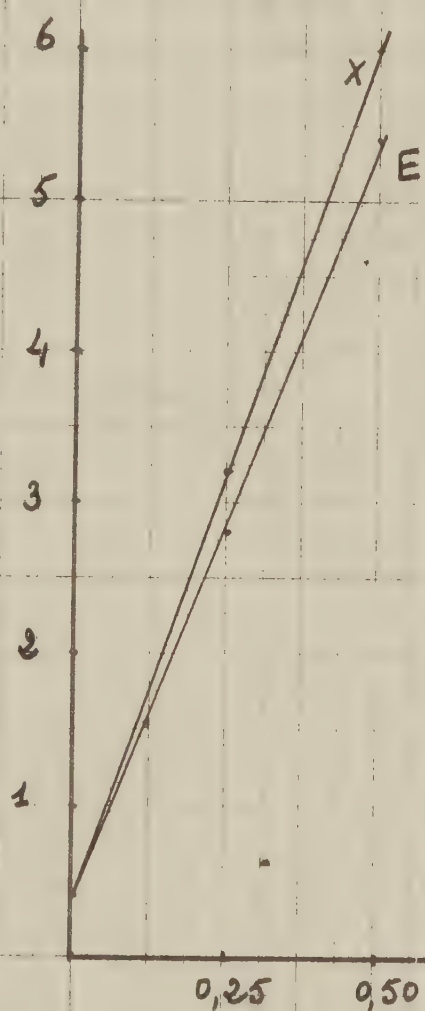
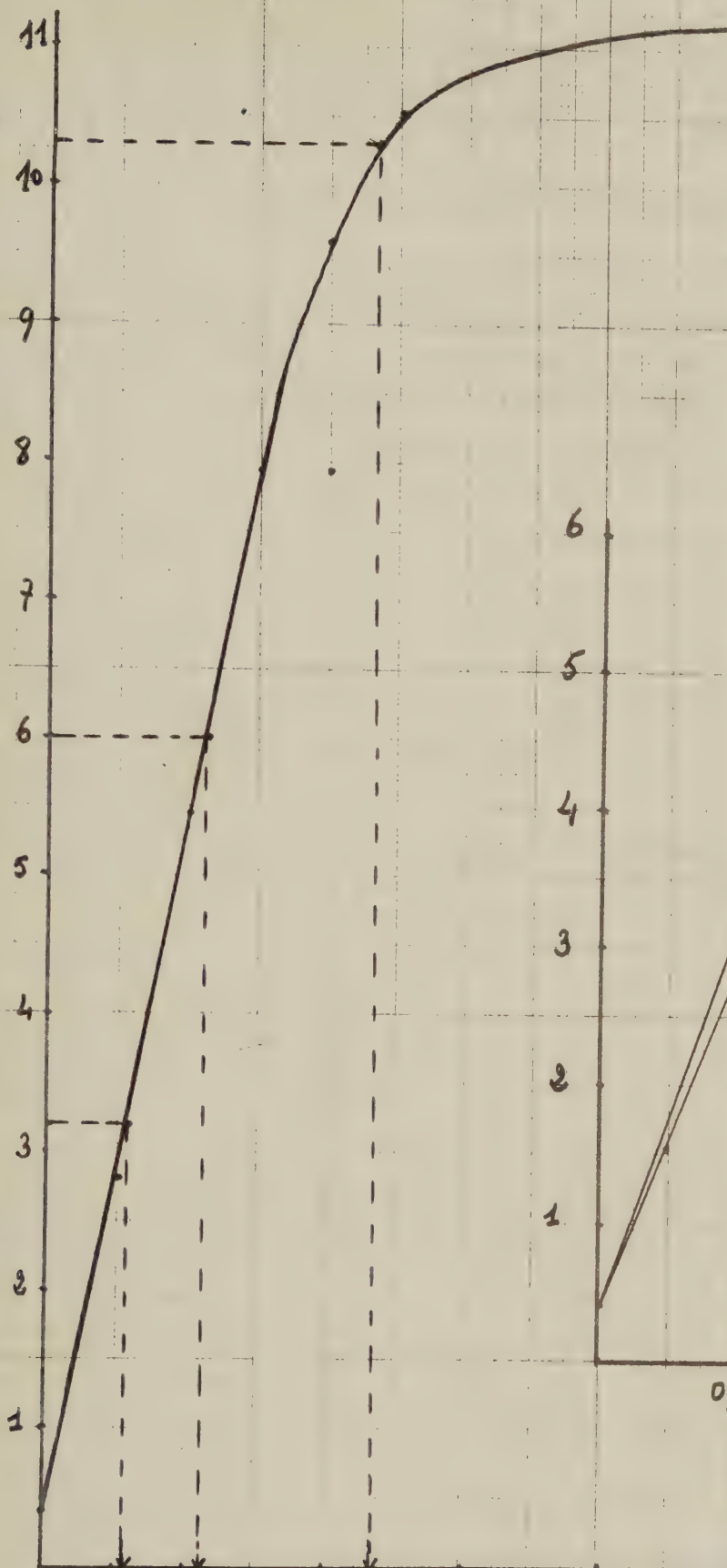
$$\frac{0,287 \times 200}{0,05} = I,148 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{0,562 \times 200}{0,10} = I,124 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{I,175 \times 200}{0,20} = I,175 \text{ mcg/ml}$$

moyenne : I,149 mcg/ml, soit I,15 g/l
de L méthionine.

ml de soude / 20



concentration
0,25 0,50 1 1,50 2 2,50
mg de L méthionine/ml

Interprétation par la méthode statistique

Pour appliquer la méthode statistique nous n'avons utilisé que les résultats correspondant aux concentrations 0,25 et 0,50 mcg/ml. En effet, il est visible, d'après la courbe étalon, que la relation dose-réponse est linéaire jusqu'à la concentration 0,75 mcg/ml mais que la courbe étalon s'incurve au delà.

Nous avons donc réalisé un dosage en 5 points :

1 point correspondant au témoin sans méthionine

2 points pour la courbe étalon $E_1 = 0,25$ mcg/ml
et $E_2 = 0,50$ mcg/ml

2 points pour la courbe échantillon X_1 et X_2

correspondant théoriquement aux mêmes concentrations

Les différentes valeurs sont résumées dans le tableau n° 9.

TABLEAU n° 9

	blanc	E_1	E_2	X_1	X_2			
Réponses y	0,40	3	5	3,3	6,3	déterminations $n = 3$		
	0,40	2,7	6,2	3,2	5,8			
	0,40	2,8	5,2	3,2	5,9			
T_d	1,2	8,5	16,4	9,7	18	$\sum x_i T_d$	$n \sum x_i^2$	variance
R	0	0,3	1,2	0,1	0,4			
Coefficients x_i pour :								
Pente étalon	0	1	2	0	0	$T_b = 41,3$		
Pente échantillon	0	0	0	1	2	$T_{b'} = 45,7$		
Déviat. de la dose 0	2	- 2	1	- 2	1	$T_c = 0,40$	14x3	0,003
Intersection de la dose 0	0	2	- 1	- 2	1	$T_{c'} = -0,8$	10x3	0,021

Les coefficients x_i sont ceux donnés par la table XXI de J. PHILIPPE, pour un essai factoriel dose-réponse à 5 points.

On calcule d'abord T_d , la somme des réponses à chacune des doses, puis les produits de chaque T_d avec les coefficients x_i pour avoir les sommes des produits $\sum x_i T_d$.

Le calcul du titre est précédé par celui de l'intersection a' commune aux deux droites à la dose $x = 0$ et b_E et b_X pentes de la droite étalon et de la droite échantillon.

$$\begin{aligned} a' &= \left[10 \sum y - 6 (T_b + T_{b'}) \right] / 14 n \\ &= (10 \times 53,8 - 6 \times 87) / 14 \times 3 \\ &= 0,38095 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} b_E &= (T_b - 3 n a') / 5n \\ &= (41,3 - 3 \times 3 \times 0,38095) / 5 \times 3 \\ &= 2,524 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} b_X &= (T_{b'} - 3 n a') / 5n \\ &= (45,7 - 3 \times 3 \times 0,38095) / 5 \times 3 \\ &= 2,818 \end{aligned}$$

Pour que l'essai soit valide, il faut que, aux erreurs expérimentales près, les deux droites tracées séparément, passent par le point déterminé par le blanc sans présenter de courbure et qu'elles se croisent sur l'ordonnée à $x = 0$.

Cette validité, qui est vérifiée dans le cas présent par une simple analyse graphique (voir schéma ci-joint), peut être également vérifiée statistiquement : on calcule la variance de l'erreur expérimentale s^2 que l'on peut estimer à partir de l'écart type calculé en utilisant l'amplitude des 5 groupes de mesures :

$$\bar{R} = \frac{0 + 0,3 + 1,2 + 0,1 + 0,4}{5} = 0,4$$

$$s = \bar{R} / d^2$$

$$d^2 \text{ est donné dans la table VIII pour } n_2 = 3 \\ d^2 = 1,693$$

$$\text{l'écart type } s = 0,4 / 1,693 = 0,236$$

$$\text{la variance } s^2 = 0,0556$$

" Les totaux T_c et T_d , mesurent, le premier (dose zéro) dans laquelle mesure les réponses obtenues pour le blanc dévient de a' calculé, le second (intersection) dépend de la différence entre les deux réponses calculées pour $x = 0$ à partir des deux droites tracées séparément. Les sommes des carrés correspondantes sont calculées à l'aide de la formule $(\sum x_i T_d)^2 / n \sum x_i^2$ et sont comparées à la variance s^2 par un test F avec 1 et 10 DL." (27)

$$F = \frac{0,0038}{0,0556} = 0,06 \quad F' = \frac{0,0213}{0,0556} = 0,3$$

Ces valeurs sont comparées à celles de F théorique données par la table IV p 339 de J. PHILIPPE.

Aucune des deux n'est significative.

Calcul de l'activité relative : Après avoir vérifié la validité du dosage on calcule l'activité relative d'après la formule :

$$R' = b_X / b_E = 2,81809 / 2,52476 = 1,116$$

Le titre de l'échantillon est estimé à 1.000 mcg/ml

Le titre réel est : $1.000 \times 1,116 = 1.116$ mcg/ml

soit : 1,11 g/l

Limites de confiance :

On calcule la variance de l'activité relative R'

$$s_{R'}^2 = 2 s^2 (8 R'^2 - 9 R' + 8) / 35 n b_E^2$$

$$= 0,001306$$

$$\text{l'écart type est} = \sqrt{0,001306} = 0,0361$$

Les limites de confiance sont données d'après la formule :

$$R' \pm t s_{R'} \quad t = 2,23 \text{ (d'après la table V pour } P = 0,05 \text{ et 10 DL)}$$

$$1,11 \pm 2,23 \times 0,0361 = 1,030 \text{ et } 1,190 \text{ mcg/ml}$$

soit : 1,03 à 1,19 g/l

Le titre calculé est donc $1,11 \pm 7 \%$

La valeur obtenue, avec la méthode de lecture directe d'après la courbe étalon à 11 points est 1,15 g/l, elle se trouve bien entre les limites indiquées.

b) DOSAGE de la PHENYLALANINE

La solution de l'acide aminé étalon est préparée à 100 mcg/ml ; ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de dosage :

0,50 I 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 et 5 mcg/ml
de L phénylalanine.

Le protéolysat est dilué au 1/10, la concentration théorique étant 1.000 mcg/ml.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Etablissement de la courbe étalon

conc. en L phénylalanine	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20			Moyenne
en mcg/ml	en ml			
0	0,30	0,40	0,30	0,30
0,5	2,6	2,2	2,3	2,35
1	3,6	3,9	3,7	3,75
1,5	5,1	5,2	5,1	5,1
2	7,3	6,5	7,1	6,95
2,5	8,4	8.	8.	8.1
3	9,2	8,9	8,9	9
3,5	10,1	10,1	10	10,05
4	10,9	11,2	10,7	10,9
4,5	12	11,7	12	11,9
5	12,5	12,5		12,5

Ces valeurs ont servi à construire la courbe étalon, qui se montre utilisable sur toute sa longueur.

Quté de sol. au 1/10	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20			Moy.	conc. en L phénylal. par ml
0,05 ml	2,1	2,4	2,3	2,25	0,475 mcg
0,10	3,6	3,6	3,7	3,6	0,90
0,20	6,3	6,2	6,4	6,3	1,85
0,30	8,9	8,5	8,6	8,65	2,80
0,40	10,4	10,1	10,6	10,35	3,65

Concentration du protéolysat :

$$\frac{0,475 \times 100}{0,05} = 950 \text{ mcg/ml}$$

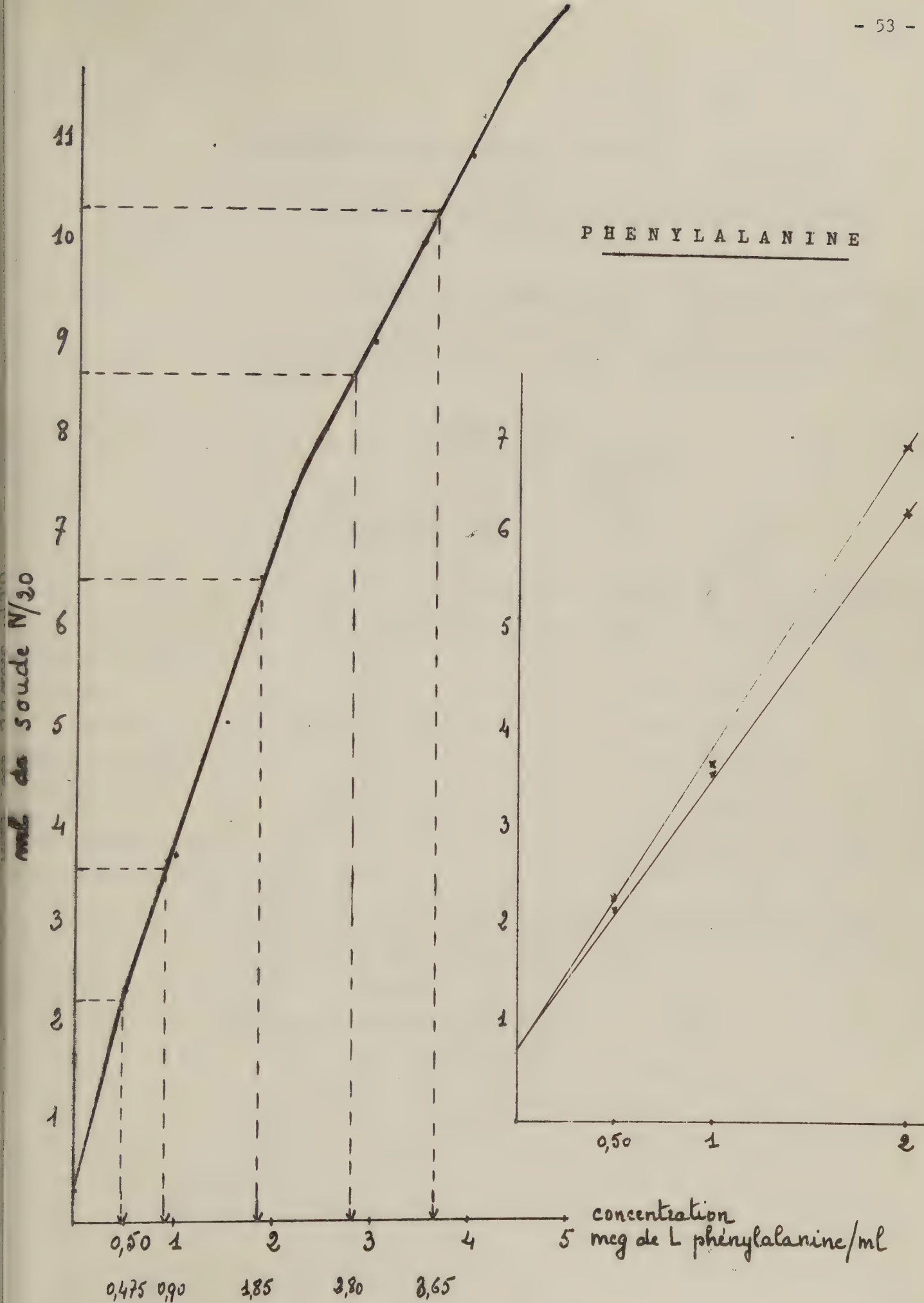
$$\frac{0,90 \times 100}{0,10} = 900 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{1,85 \times 100}{0,20} = 925 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{2,80 \times 100}{0,30} = 933 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{3,65 \times 100}{0,40} = 912 \text{ mcg/ml}$$

Moyenne : 924 mcg/ml, soit 0,92 grammes/litre
de L phénylalanine.



Interprétation par la méthode statistique

Nous avons choisi trois concentrations pour ce dosage :

0,5 I et 2 mcg/ml.

Le tableau n° 10 résume les calculs nécessaires pour obtenir les valeurs de Tb, Tb' Tc, Tc', Td et Td', avec les coefficients qui sont donnés dans le tableau n° 21 de J. PHILIPPE pour un essai factoriel dose-réponse à 7 points .

TABLEAU n° 10

	Blanc	E _I	E ₂	E ₃	K _I	K ₂	X ₃	n = 3		
	0,3	2,6	3,6	7,3	2,1	3,6	6,3			
	0,4	2,2	3,9	6,5	2,4	3,6	6,2			
	0,3	2,3	3,7	7,1	2,3	3,7	6,4			
Td	I	7,1	11,2	20,9	6,8	10,9	18,9	$\sum x_i T_d$	$n \sum x_i^2$	Varian.
R	0,1	0,4	0,3	0,8	0,3	0,1	0,2			
coefficients x _i pour :										
te étalon	0	I	2	3	0	0	0	Tb = 92,2		
te échantillon	0	0	0	0	I	2	3	Tb' = 85,3		
viation de la dose 0	6	-4	-I	2	-4	-I	2	Tc = 7,9	78x3	0,26
ersection de la dose 0	0	4	I	-2	-4	-I	2	Tc' = 2,5	42 x3	0,049
rbure droite étalon	0	I	-2	I	0	0	0	Td = 5,6	6 x3	I,74
rbure droite échant	0	0	0	0	I	-2	I	Td' = 3,9	6 x3	0,84

L'intersection commune des deux droites est donnée par la formule :

$$a' = \left[7 \sum y - 3 (Tb + Tb') \right] / 13 n$$

$$= 0,1307$$

On calcule ensuite b_E et b_X d'après les formules :

$$b_E = (Tb - 6 n a') / 14 n = 2,1868$$

$$b_X = (Tb' - 6 n a') / 14 n = 1,9749$$

Validité du dosage :

On calcule d'abord la variance de l'erreur expérimentale d'après l'écart type donné par la formule : $s = \bar{R} / d^2$

$$\bar{R} = 0,3 \quad d^2 = 1,693$$

$$s = 0,1772$$

la variance : $s^2 = 0,0314$

Les variances de chaque poste indiqué dans le tableau n° 10 sont comparées à la variance de l'erreur expérimentale par un test F avec 1 et 14 DL.

$$\frac{0,26}{0,0314} = 0,7 \text{ non significatif}$$

$$\frac{0,049}{0,0314} = 1,5 \text{ non significatif}$$

$$\frac{1,74}{0,0314} = 55 \text{ significatif}$$

$$\frac{0,84}{0,0314} = 26 \text{ significatif}$$

Ces résultats montrent que la courbure des deux droites n'est pas négligeable.

Calcul de l'activité relative

$$R' = b_X / b_E = 0,903$$

Le titre théorique est 1.000 mcg/ml

Le titre réel est : $1.000 \times 0,903 = 903 \text{ mcg/ml}$ soit 0,90 g/l

Limites de confiance

La variance de l'activité relative est donnée par la formule :

$$s_{R'}^2 = s^2 (3I R'^2 - 36 R' + 3I) / 182 n b^2 = 0,000285$$

$$\text{l'écart type} = \sqrt{0,000285} = 0,017$$

$$R' \pm t s_{R'} \quad t = 2,15 \text{ pour } P = 0,05 \text{ et } 14 \text{ DL}$$

$$0,903 \pm 2,15 \times 0,017 = 0,867 \text{ et } 0,939$$

$$1.000 \times 0,939 = 939 \text{ mcg/ml}$$

$$1.000 \times 0,867 = 867 \text{ mcg/ml} \quad \text{de } 0,86 \text{ à } 0,94 \text{ g/l}$$

La valeur du titre indiqué plus haut, déterminé par la lecture directe sur la courbe étalon à 11 points, est 0,92 g/l, elle se trouve bien dans ces limites.

c) DOSAGE de la THREONINE

La solution mère de l'acide aminé étalon est préparée à 200 mcg/ml, ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de dosage :

I 2 3 4 5 6 7 8 9 et 10 mcg/ml de
L thréonine.

Le protéolysat a été dilué au I/10, la concentration théorique étant 2.000 mcg/ml.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Etablissement de la courbe étalon

Conc. en L thréonine	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20			Moyenne
en mcg/ml		ml		
0	0,9	I	I	0,95
I	I,4	I,5	I,3	I,3
2	I,7	I,6	I,6	I,6
3	2,2	2,1	2,3	2,2
4	3,3	3,5	3	3,25
5	4,7	4,4	4,4	4,5
6	5,8	5,5	5,7	5,65
7	7,5	7,5	7,4	7,45
8	8,5	8,8	8,8	8,7
9	9,8	9,7	9,8	9,75
10	10	10,1	10,1	10,05

Ces valeurs ont servi à construire la courbe ci-jointe, qui montre qu'entre 3 et 9 mcg/ml la courbe est une droite. Les chiffres retenus pour le calcul sont donc ceux obtenus en ajoutant dans le milieu de culture 0,20, 0,30 et 0,40 ml de solution au I/10 de l'hydrolysate examiné.

Quté de sol. au I/10	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20 en ml			Moyenne	conc. en L.thréonine par ml.
0,20	3,3	3,2	3,1	3,2	3,95 mcg
0,30	5,5	5,6	5,8	5,6	5,70
0,40	8,2	8,3	8,3	8,25	7,70

Concentration de l'hydrolysate :

$$\frac{3,95 \times 100}{0,20} = 1,975 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{5,90 \times 100}{0,30} = 1,966 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{7,70 \times 100}{0,40} = 1,925 \text{ mcg/ml}$$

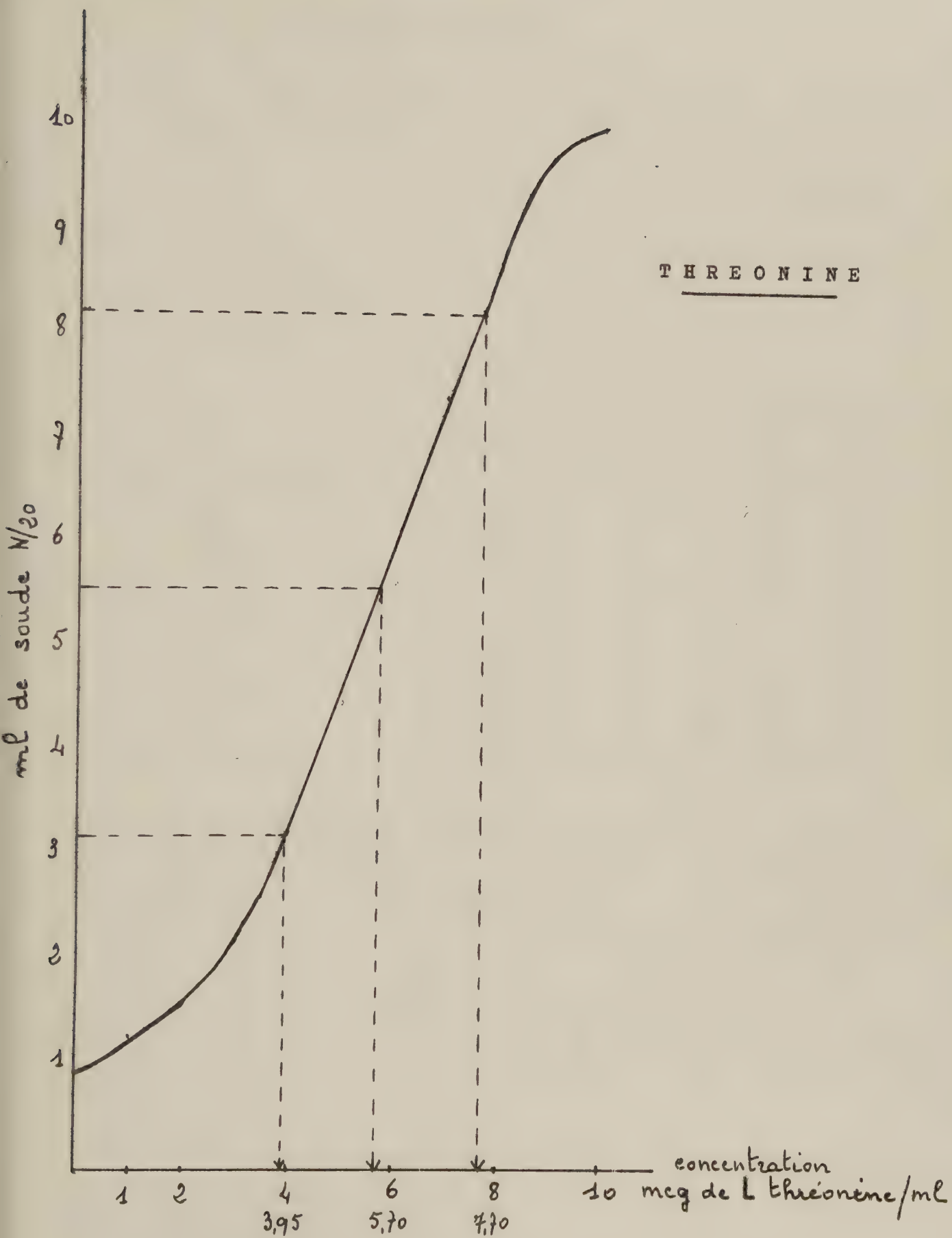
Moyenne : 1,955 mcg/ml

soit 1,95 grammes/litre
de L thréonine.

La méthode statistique a montré une déviation importante de la dose 0.

L'activité relative est égale à 1 ; ce qui donne une concentration de 2.000 mcg/ml, soit 2,00 g/l avec des limites de confiance de 1,93 à 2,07 g/l.

La valeur indiquée plus haut, 1,95 g/l se trouve bien dans ces limites.



d) DOSAGE DE LA LEUCINE

La solution de l'acide aminé étalon est préparée à 100 mcg/ml ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de dosage :

0,50 I 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 et 5 mcg/ml de L leucine.

Le protéolysat est dilué à 1/15, la concentration théorique étant 1.500 mcg/ml.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Etablissement de la courbe étalon

conc. en L leucine	Qté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20			Moyenne
en mcg/ml	ml			
0	0	0	0	0
0,5	0,7	0,7	0,8	0,7
1	2,3	2,6	2,1	2,3
1,5	3,6	3,6	3,7	3,65
2	4,9	4,8	4,9	4,85
2,5	6	5,9	6,1	6
3	6,9	6,8	6,8	6,8
3,5	7,7	7,6	7,5	7,6
4	8,3	8,2	8,2	8,2
4,5	9,2	9,3	8,9	9,15
5	9,7	9,9	9,9	9,8

Ces valeurs ont servi à construire la courbe étalon ci-jointe qui est utilisable sur toute sa longueur.

Qté de sol. au 1/15	Qté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20 en ml			Moyenne	Conc. en L.leucine/ml
0,05	1,4	1,6	1,8	1,6	0,82 mcg
0,10	3,8	4	3,9	3,9	1,60
0,20	7,6	7,6	7,6	7,6	3,50
0,30	9,6	9,6	9,9	9,7	4,90
0,40	10,2	10,2	10,3	10,2	sort de la courbe.

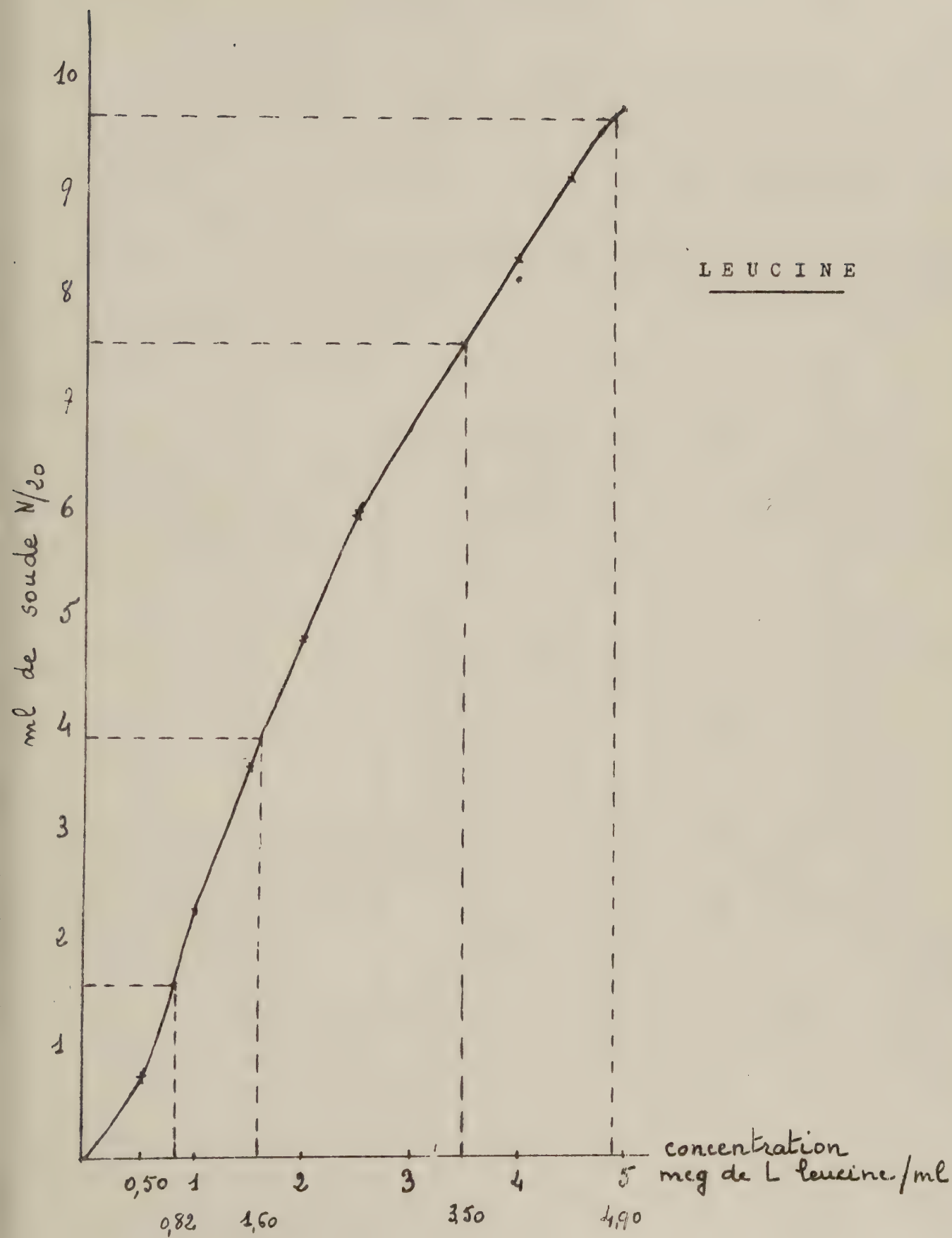
Concentration du protéolysat :

$$\begin{array}{lcl} \frac{0,82 \times 150}{0,05} & = & 2.460 \text{ mcg/ml} \qquad \frac{3,60 \times 150}{0,20} = 2.625 \text{ mcg/ml} \\ \frac{1,60 \times 150}{0,10} & = & 2.400 \text{ mcg/ml} \qquad \frac{4,90 \times 150}{0,30} = 2.450 \text{ mcg/ml} \end{array}$$

moyenne : 2.483 mcg/ml , soit 2,48 grammes/litre de
L leucine.

La méthode statistique a permis, avec deux concentrations seulement (1 et 2 mcg/ml) de vérifier la validité du dosage. L'activité relative calculée est égale à 1,58 ; ce qui donne une concentration réelle de 2,37 g/l avec des limites de confiance de 2,26 à 2,47 g/l.

La valeur trouvée plus haut, 2,48 g/l est très voisine de la valeur limite.



e) Dosage de la VALINE

La solution mère de l'acide aminé étalon est préparée à 200 mcg/ml ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de dosage :

I 2 3 4 5 6 7 8 9 et 10 mcg/ml de L valine.

La concentration du protéolysat étant supposée égale à 2.500 mcg/ml, le protéolysat est dilué à raison de 1 ml pour 12,5 ml d'eau distillée stérile, soit 1/12,5.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Etablissement de la courbe étalon

Conc. en L valine	Qté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20			Moyenne
en mcg/ml	en ml			
0	0	0	0	0
1	2,3	2,4	2,4	2,2
2	4,9	4,1	4,5	4,5
3	6,6	6,7	6,6	6,6
4	8,5	8,4	8,3	8,4
5	10,1	10,1	10	10,05
6	11,1	11,1	10,9	11,1
7	11,7	11,8	11,9	11,8
8	12,2	12,5	12,5	12,4
9	13,1	13,0	13,2	13,1
10	13,5	13,5	13,8	13,6

Ces valeurs ont servi à construire la courbe ci-jointe qui se montre utilisable pour le dosage au dessous de 5 mcg/ml.

Qté de sol. au 1/12,5	Qté de sol. d'hydroxyde de sodium N/ 20 en ml.			Moyen.	conc. en L.valine/ml.
0,05 ml	2,4	2,9	2,8	2,7	1,20 mcg
0,10	5,2	5,3	5,4	5,3	2,35 g
0,20	9,3	9	8,9	9,05	4,40

Concentration de l'hydrolysate :

$$\frac{1,20 \times I25}{0,05} = 3.000 \text{ mcg/ml}$$

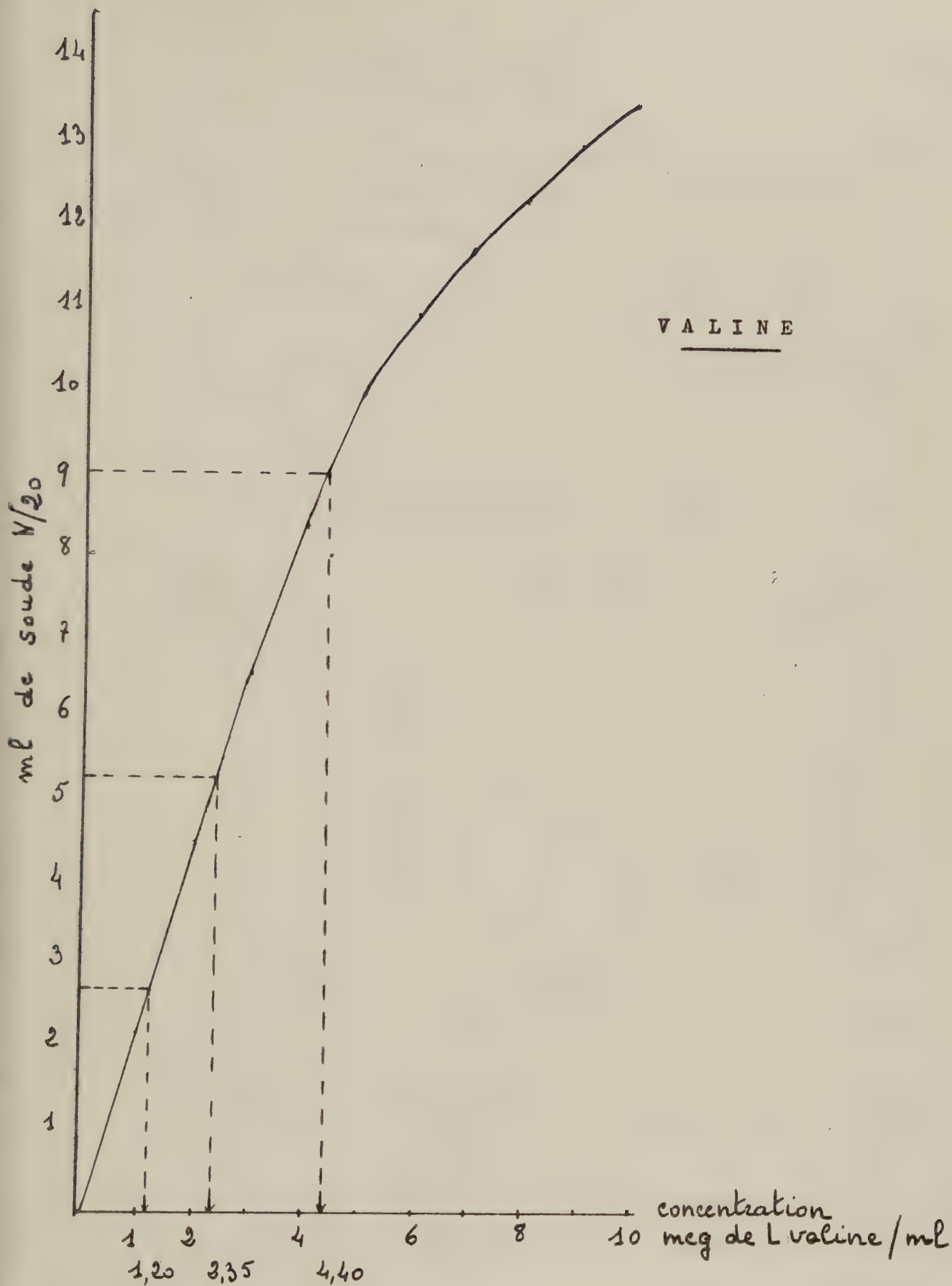
$$\frac{2,35 \times I25}{0,10} = 2.937,5 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{4,40 \times I25}{0,20} = 2.750 \text{ mcg/ml}$$

Moyenne : 2.895 mcg/ml, soit 2,89 grammes/litre
de L valine.

L'étude statistique a été faite avec les points correspondant à 1 et 2 mcg/ml.

La validité du dosage a été vérifiée. Le titre calculé est égal à 2,95 g/l avec des limites de confiance de 2,72 à 3,17 g/l. La valeur trouvée plus haut : 2,89 g/l se trouve bien dans les limites indiquées.



F) DOSAGE de l'ISOLEUCINE

La solution de l'acide aminé étalon est préparée à 100 mcg/ml, ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de dosage :

0,5 I 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 et 5 mcg/ml
de L isoleucine.

La concentration du protéolysat étant théoriquement de 2.000 mcg/ml, celui-ci a été dilué au 1/20.

Les résultats suivants ont été obtenus :

Etablissement de la courbe étalon

conc. en L isoleucine	Qté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20			Moyenne
en mcg/ml	en ml			
0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
1	0,1	0,2	0,2	0,15
1,5	0,5	0,7	0,8	0,65
2	2	2,1	2,1	2,05
2,5	3,4	4	3,9	3,75
3	5,2	5,2	5,4	5,25
3,5	7,6	7,3	7,4	7,4
4	8,4	8,6	8,2	8,4
4,5	9,7	9,3	9,2	9,4
5	10,4	9	11,2	10,2

Ces valeurs ont servi à construire la courbe étalon ci-jointe qui paraît utilisable pour le dosage entre 1,5 et 4 mcg/ml.

Qté de sol. au 1/20.	Qté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20 en ml			Moyenne	Conc. en L isoleucine/ ml.
0,20	1,7	1,9	2	1,85	1,95
0,30	4,7	4,9	4,6	4,75	2,85
0,40	7,4	7,6	7,5	7,5	3,75

Concentration de l'hydrolysate :

$$\frac{1,95 \times 200}{0,20} = 1,950 \text{ mcg/ml}$$

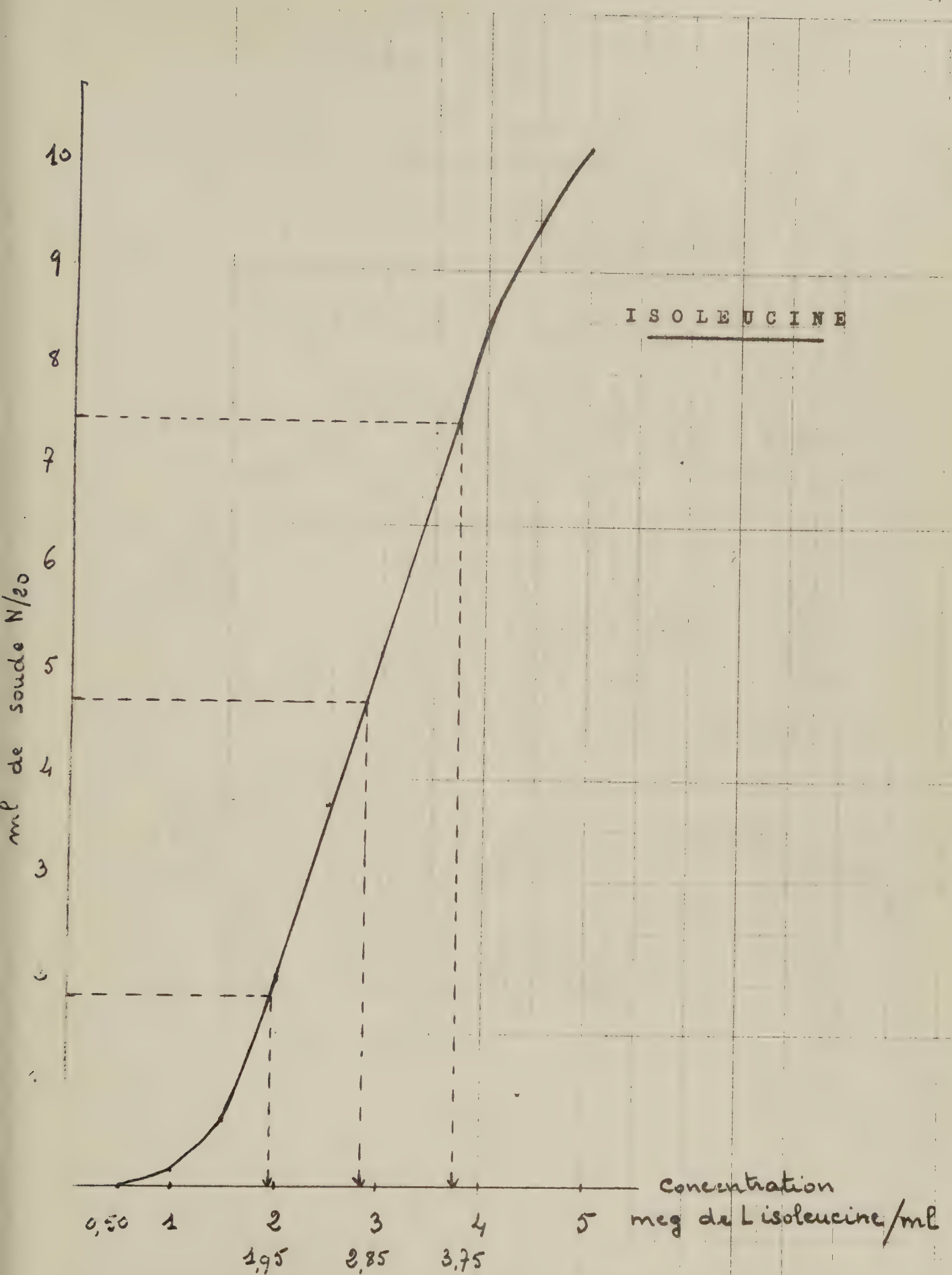
$$\frac{2,85 \times 200}{0,30} = 1,900 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{3,75 \times 200}{0,40} = 1,875 \text{ mcg/ml}$$

Moyenne : 1.908 mcg/ml, soit 1,90 gramme/l
de L isoleucine.

L'étude statistique portant sur les résultats obtenus avec trois concentrations 2, 3 et 4 mcg/ml a permis de vérifier la validité du titrage, de calculer le titre 1,80 g/l avec des limites de confiance de 1,76 à 1,84 g/l.

La valeur obtenue ci-dessus, 1,90 g/l, s'écarte légèrement de ces limites.



g) DOSAGE de la LYSINE

La solution de l'acide aminé étalon est préparée à 400 mcg/ml ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de dosage :

2 4 6 8 10 12 14 16 18 et 20 mcg/ml.

Le protéolysat est dilué au 1/5, la concentration théorique étant 2.000 mcg/ml.

Les résultats suivants ont été obtenus :

Etablissement de la courbe étalon

conc. en L lysine	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20			Moyenne
en mcg/ml	en ml			
0	3,3	3,2	3,3	3,25
2	4,5	4,6	4,6	4,55
4	6,9	6,8	6,9	6,8
6	8,7	8,7	8,9	8,75
8	10,3	10,3	10,4	10,3
10	11,6	11,7	12	11,75
12	12,8	12,4	12,6	12,6
14	13,4	13,2	12,9	13,15
16	13,8	13,3	13,8	13,6
18	14,1	14,3	14	14,1
20	13,6	14,2	13,8	13,85

Ces valeurs ont servi à construire la courbe ci-jointe, qui se montre utilisable jusqu'à 18 mcg/ml.

Quté de sol. au 1/5	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20 en ml			Moyenne	Conc. en L lysine/ml
0,05	4,2	4,4	4,3	4,3	1,8 mcg
0,10	6,1	6,2	6	6,1	3,5
0,20	9,5	9,5	9,8	9,6	7,2
0,30	12,1	12,1	12,1	12,1	10,8
0,40	13,2	13,1	13,7	13,3	14,8

Concentration de l'hydrolysate :

$$\frac{1,8 \times 50}{0,05} = 1.800 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{10,8 \times 50}{0,30} = 1.800 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{3,5 \times 50}{0,10} = 1.750 \text{ mcg/ml}$$

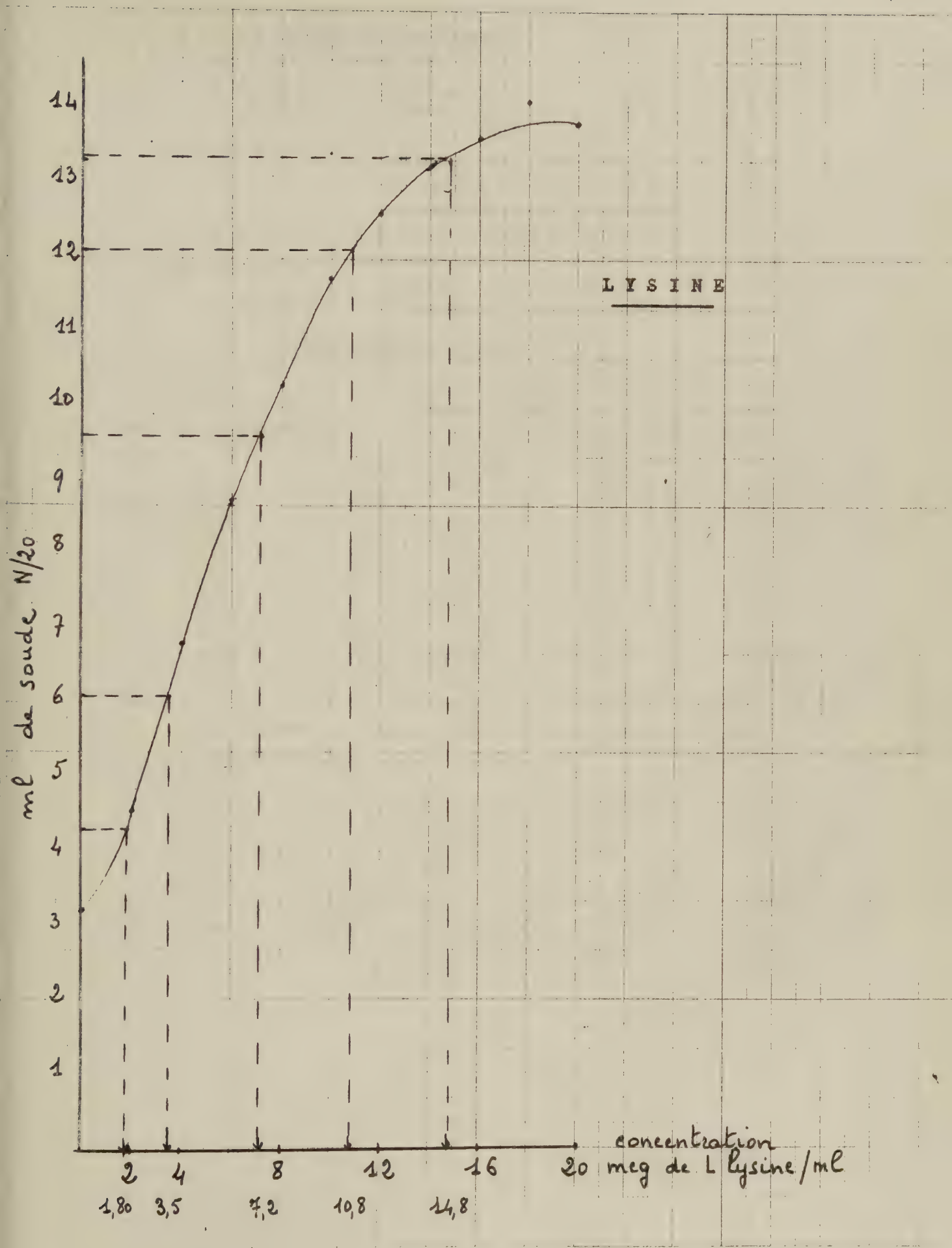
$$\frac{14,8 \times 50}{0,40} = 1.825 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{7,2 \times 50}{0,20} = 1.800 \text{ mcg/ml}$$

Moyenne : 1.795 mcg/ml, soit 1,79 grammes/litre
de L lysine

L'étude statistique, faite en utilisant les résultats obtenus avec trois concentrations (2, 4 et 8 mcg/ml), a permis de vérifier la validité du dosage, de calculer le titre 1,77 g/l avec des limites de confiance de 1,74 à 1,81 g/l.

La valeur indiquée plus haut 1,79 g/l se trouve bien dans ces limites.



n) DOSAGE du TRYPTOPHANE

La solution de l'acide aminé étalon est préparée à 50 mcg/ml ;
ce qui permet de réaliser les concentrations suivantes dans le milieu de dosage :

0,25 0,50 0,75 I I,25 I,5 I,75 2 2,25 et 2,5
mcg/ml de L. tryptophane

Le protéolysat est dilué au I/10, la concentration théorique étant 500 mcg/ml

Les résultats suivants ont été obtenus :

Etablissement de la courbe étalon

conc. en L. tryptophane	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20.			Moyenne
en mcg/ml	en ml			
0	0,50	0,40	0,50	0,45
0,25	4,4	4,5	4,4	4,45
0,50	7,2	7,8	7,7	7,55
0,75	9,9	9,8	10	9,9
I	I2,6	I2,2	I2,3	I2,35
I,25	I3,9	I3,9	I4,2	I4
I,5	I5,1	I5,1	I5,2	I5,1
I,75	I6,2	I6,2	I6,1	I6,15
2	I6,6	I6,1	I6,5	I6,40
2,25	I6,6	I6,7	I6,4	I6,55
2,50	I6,1	I6		I6,05

Ces valeurs ont servi à construire la courbe ci-jointe,
qui paraît utilisable jusqu'à I,75 mcg/ml.

Quté de sol. au I/10	Quté de sol. d'hydroxyde de sodium N/20 en ml			Moyenne	conc. en L tryptophane/ml
0,05 ml	5	4,3	4,4	4,55	0,262 mcg
0,10	8,3	7,3	7,5	7,7	0,525
0,20	I2,3	II,9	I2,2	I2,1	0,975
0,30	I4,7	I5,2	I5,1	I5	I,463

Concentration de l'hydrolysat :

$$\frac{0,262 \times 100}{0,05} = 524 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{0,525 \times 100}{0,10} = 525 \text{ mcg/ml}$$

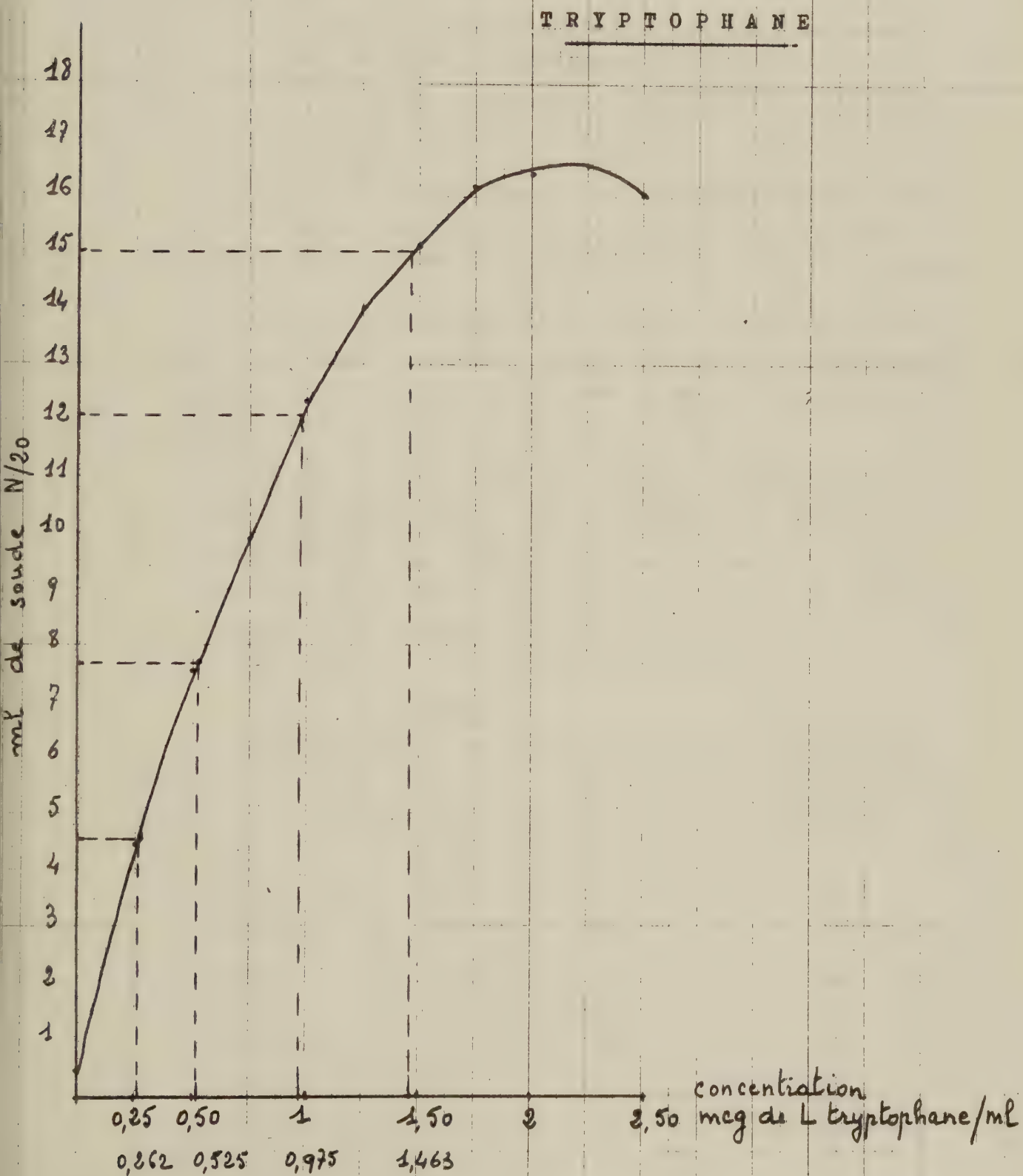
$$\frac{0,975 \times 100}{0,20} = 487 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{1,463 \times 100}{0,20} = 487 \text{ mcg/ml}$$

Moyenne : 506 mcg/ml, soit 0,50 grammes par litre
de L tryptophane

L'étude statistique a permis de vérifier la validité du dosage portant sur deux concentrations 0,25 et 0,50 mcg/ml. Le titre calculé est 0,51 g/l avec des limites de confiance de 0,47 à 0,54 g/l.

La valeur indiquée plus haut 0,50 g/l se trouve bien dans cette limite.



L'étude des huit dosages d'acides aminés par la méthode statistique nous permet de faire certaines remarques :

- La relation dose-réponse n'est linéaire que dans des limites très étroites pour les plus faibles concentrations. Il a été possible de faire un essai à 7 points avec la lysine, la thréonine, la phénylalanine et l'isoleucine, mais seulement à 5 points avec les autres acides aminés.
- Avec la leucine, la courbe étalon paraît comporter deux parties droites, une première partie pour les faibles concentrations et une seconde partie entre 2,5 et 5 mcg/ml.
- Avec l'isoleucine, les résultats n'ont pas été réguliers. Au cours de certains dosages les droites étalon et échantillon se coupaient pour une valeur de x très supérieure à 0.

Il faut noter cependant que les valeurs obtenues par la méthode de lecture directe sur la courbe étalon, se sont toujours trouvées (sauf dans le cas de l'isoleucine) dans les limites indiquées par la méthode statistique appliquée à 5 ou 7 points seulement ; les résultats sont donc valables.

Le tableau n° 11 résume les résultats.

TABLEAU n°11

RESULTATS OBTENUS AU COURS des 8 DOSAGES d'ACIDES AMINES.

	Lecture directe		méthode statistique		
	en gr. par litre				
L Méthionine	1,15	1,11	de 1,03 à 1,19		± 7 %
L Phénylalanine	0,92	0,90	0,86 à 0,94		± 4,5 %
L Thréonine	1,95	2,00	1,93 2,07		± 3,5 %
L Leucine	2,48	2,37	2,26 2,47		± 5 %
L Valine	2,89	2,95	2,72 3,17		± 7,5 %
L Isoleucine	1,90	1,80	1,76 1,84		± 2,5 %
L Lysine	1,79	1,77	1,74 1,81		± 2,5 %
L Tryptophane	0,50	0,51	0,47 0,54		± 7 %

B - DOSAGE MICROBIOLOGIQUE PAR LA METHODE DE R. LELUC.

Le dosage microbiologique, mis au point par R. LELUC (18), est basé sur un principe différent du dosage précédent. Il est inspiré du test de R. GUTHRIE (10) appliqué au dépistage systématique des taux sanguins en L phénylalanine anormalement élevés. Le principe en est le suivant :

L'inhibition de croissance d'un germe, provoquée par un analogue de structure d'un acide aminé, peut être levée par addition au milieu de culture de l'acide aminé en question. La méthode par diffusion, généralement appliquée au dosage de certains antibiotiques, est utilisable, en introduisant dans le milieu de culture gélosé l'inhibiteur et en ajoutant, à l'aide de disques ou de cylindres la solution d'acide aminé à doser à des dilutions variables. La zone de croissance bactérienne autour des disques ou des cylindres est d'autant plus intense que la quantité d'acide aminé présente est grande. R. LELUC a mis au point une technique de dosage qu'il a essayé de rendre applicable pour plusieurs acides aminés en utilisant un même milieu de culture, une même souche bactérienne, seul variant l'inhibiteur, analogue de structure de l'acide aminé à doser.

PROTOCOLE de l'ESSAI

R. LELUC préconise la souche Bacillus subtilis ATCC 6633 (I.P. 5262). Le milieu de conservation indiqué par l'auteur a la composition suivante :

Peptone	6 g
Protéolysat de caséine	4 g
Extrait de viande de boeuf ..	3 g
Glucose	1,5 g
Gélose en poudre	12 g
Eau distillée ... Q.S.P....	1.000 ml.

pH 6-6,5 après stérilisation 30 min. à 115°C.

R. LELUC prépare la suspension de spores à partir d'une culture de B. subtilis sur le même milieu coulé en fioles de Roux. Nous préférons, pour la préparation des spores, le milieu de culture suivant :

Peptone bactériologique	6 g
Peptone de caséine	3 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de viande	1,50 g
Sulfate de manganèse	0,001 g
Gélose	15 g
Eau distillée Q.S.P.....	1.000 ml

pH 6,5 - 6,6, après stérilisation 20 min. à 115° C

Après huit jours d'incubation à 37°C une suspension de la culture est préparée en lavant la surface du milieu gélosé avec 30 ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue est agitée pendant 20 minutes sur agitateur magnétique, chauffée 30 minutes à 60°C, agitée, puis chauffée à nouveau et ceci trois fois afin de tuer les formes végétatives. Cette suspension de spores se garde deux mois au réfrigérateur à 4° C.

Pour l'essai, la suspension est diluée au 1/100 environ avec de l'eau distillée stérile pour obtenir une suspension ayant une densité optique à 650 nm, cuve de 1 cm, égale à 0,30-0,40 soit 40-50 % de lumière transmise.

MILIEUX de CULTURE POUR LE DCSAGE :

- milieu de base gélosé glucosé :

glucose	20 g
gélose en poudre	12 g
eau distillée Q.S.P....	500 ml

réparti à raison de 100 ml dans des fioles de 250 ml et stérilisé à 110° C pendant 30 minutes.

- milieu de base tamponné non gélosé :

phosphate bipotassique	25 g
chlorure d'ammonium	5 g
nitrate d'ammonium	5 g
sulfate de sodium 10 OH2 ..	1 g
ac. L glutamique	1 g
L asparagine	1 g
L alpha alanine	0,5 g
eau distillée Q.S.P.	500 ml

stérilisé à 110°C pendant 30 minutes.

- solution saline concentrée :

sulfate de magnésium 7 OH ₂	10 g
chlorure de manganèse 4 OH ₂	1 g
perchlorure de fer 6 OH ₂	1 g
chlorure de calcium anhydre	0,5 g
eau distillée Q.S.P.....	500 ml.

- solution de l'analogue inhibiteur :

L'analogue inhibiteur est dissous, pour les solutions les plus concentrées, dans de l'eau distillée stérile, ou dans une solution stérile de phosphate bipotassique à 2,5 g/l. La solution finale est obtenue en diluant la solution concentrée dans la solution saline ci-dessus.

PREPARATION du MILIEU au MOMENT DU DOSAGE :

- milieu de base gélosé glucosé liquéfié et maintenu à 50°C.. 200 ml
- milieu de base tamponné non gélosé amené à 60°C 200 ml
- solution saline sans inhibiteur 8 ml
- solution aqueuse ou dans le tampon phosphaté de
l'analogue inhibiteur 2 ml
(maximum).

Bien mélanger. Ensemencer le milieu maintenu à 48°C avec la suspension de spores, 1,6 ml, préparée comme il a été dit plus haut. Couler dans des boîtes de Pétri stériles de 12 cm de diamètre à raison de 25 ml par boîte (ou des boîtes de 15 cm à raison de 40 ml par boîte).

PREPARATION des SOLUTIONS de DOSAGE et des SOLUTIONS ETALONS.

Les solutions sont préparées en tampon phosphaté à 2,5 g pour 1.000 de phosphate dipotassique. Trois solutions sont préparées à des concentrations différentes pour l'étalon ; pour le dosage, une, deux ou trois dilutions peuvent être utilisées, selon les indications préalables que l'on possède sur la composition du protéolysat examiné.

Les solutions servent à imprégner des disques (Durieux type 268) de 9 mm de diamètre. Neuf boîtes sont préparées de façon identique en plaçant six disques dans chacune, trois, imprégnés des trois dilutions étalons, et trois, imprégnés des solutions à doser.

Le tableau n° 12 indique, d'après R. LELUC, pour chaque acide aminé dosé l'inhibiteur utilisé et les concentrations des solutions étalons de l'acide aminé.

TABLEAU n° 12
INHIBITEURS UTILISES POUR LE DOSAGE DES ACIDES AMINES
(d'après R. LELUC)

L acide aminé	conc.de la sol. d'ac.aminé en mg pour 100 ml			Inhibiteur	conc. de l'inhibiteur en mg pour 100 ml de milieu.
	E1	E2	E3		
méthiorine	2	4	8	L méthionine dl sulfoximine	0,15
phénylalanine	1	2	4	thiényl 2 alanine	0,342
tryptophane	5	10	15	DL méthyl 5 tryptophane	5 - 10
lysine	10	20	30	aminoéthyl L cystéine ou L thiosine	50
histidine	5	10	20	thiazole 1 2 4 alanine	1

Ce tableau est celui que R. LELUC a donné dans sa thèse (18). Les travaux qu'il a effectués depuis, lui ont permis d'apporter les modifications suivantes :

- dans le cas de la méthionine l'inhibiteur peut être aussi la séléno-méthionine ; d'autre part la L méthionine sulfoximine peut être utilisée à la concentration de 0,05 mg % au lieu de 0,15 mg %, mais nous ne sommes pas d'accord avec cette dernière modification, il nous a fallu atteindre 0,15 mg % avec la souche que nous avons utilisée.

- dans le cas de la phénylalanine l'inhibiteur peut être la fluorophénylalanine.
 - dans le cas du tryptophane, l'inhibiteur peut être le 5 ou le 6 fluorotryptophane.
 - le dosage de la lysine est difficile à mettre en oeuvre a précisé l'auteur, il est peu sensible et l'inhibiteur d'un prix très élevé ne peut être utilisé en usage courant.
 - l'inhibiteur de l'histidine n'étant pas commercialisé, le dosage ne peut être appliqué en pratique courante.
 - le dosage de la leucine a été mis au point, mais il n'est applicable que dans le cas de solutions dépourvues d'isoleucine, donc inutilisable pour les dosages portant sur les protéolysats injectables.
- Nous avons nous-même effectué des dosages dans les conditions précisées par R. LELUC pour les acides aminés et avec les inhibiteurs indiqués dans le tableau n° I3.

TABLEAU n° I3

ACIDES AMINES ET INHIBITEURS UTILISES PAR NOUS

L acide aminé	conc. de la sol. d'ac. aminé en mg pour 100 ml			Inhibiteur	conc. de l'inhibiteur en mg pour 100 ml de milieu.
	E1	E2	E3		
méthionine	0,5	1	2	L méthionine	0,15 0,342 0,75
phénylalanine	1	2	4	DL sulfoximine	
tryptophane	2,5	5	10	thiényl 2 alanine 6 fluorotryptophane	

I - DOSAGE de la PHENYLALANINE

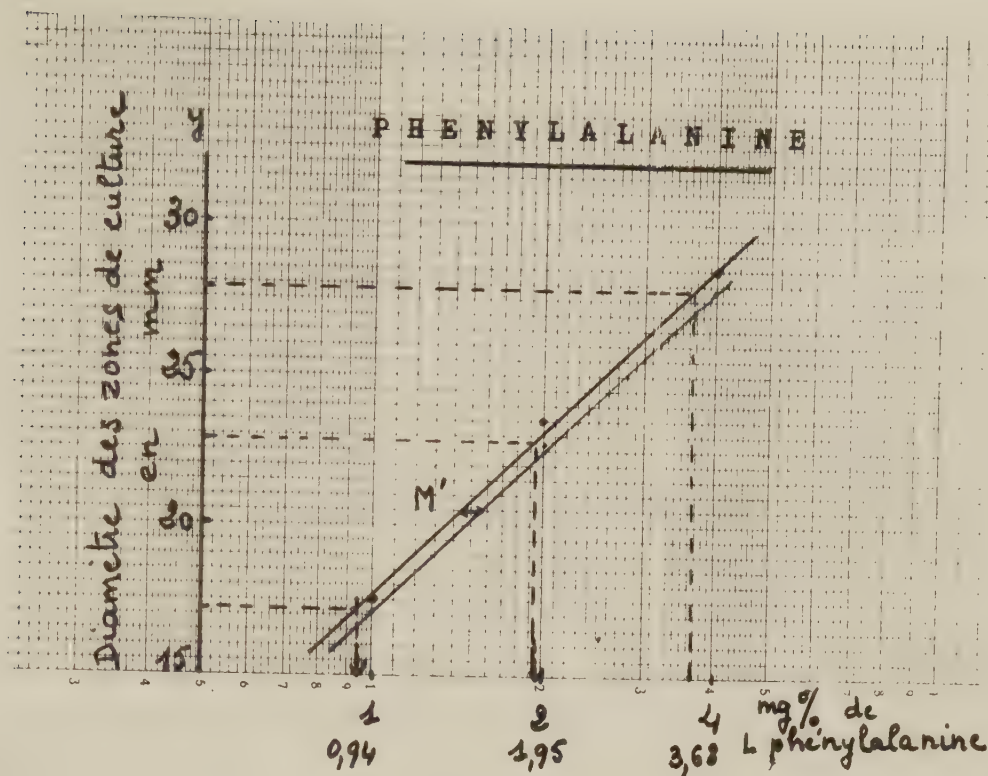
La mesure des diamètres des zones de culture a donné les résultats suivants avec les trois solutions étalons renfermant 1, 2 et 4 mg %.

	<u>E₁</u>	<u>E₂</u>	<u>E₃</u>
	17	23	29
	19	24	30
	16	23	27
	17	25	28
	17	23	26
	18	24	29
	17	23	28
	18	24	29
	19	25	29
Moyennes	17,5	23,7	28,3

Ces valeurs ont servi à établir la courbe d'étalonnage ci-dessous.

Les diamètres suivants ont été obtenus au cours du dosage de cet acide aminé dans un protéolysat dont la concentration était supposée être égale à 1.500 mg/ l (les dilutions au tiers ayant servi à préparer les dilutions théoriquement à 1, 2 et 4 mg%).

	<u>X₁</u>	<u>X₂</u>	<u>X₃</u>
	18	24	28
	18	23	28
	16	24	26
	17	21	27,5
	17	21,25	27
	17,5	23,5	30
	17	23	30
	17,5	21,5	29
	17,25	23	26
Moyennes:	17,25	22,8	27,8



Les concentrations réelles sont les suivantes :

pour 1 mg %	il y a réellement 0,94, soit	94 % de la valeur théorique
pour 2	" " 1,95, soit	97,5 % " "
pour 4	" " 3,68, soit	92 % " "

Moyenne : 94,5 %

Le protéolysat était supposé renfermer 1.500 mg par litre ;
il renferme en réalité :

$$\frac{1.500 \times 94,5}{100} = 1.417,5 \text{ mg/l}$$

soit : 1,42 g/l de L phénylalanine.

INTERPRETATION STATISTIQUE DU DOSAGE

Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en acide aminé et la réponse obtenue. La droite étalon et la droite échantillon sont pratiquement parallèles. La distance horizontale entre les deux droites M' est une valeur constante quel que soit le niveau de y . Si les deux droites ne sont pas parallèles, la valeur de M' varie selon ce niveau, le titrage n'a aucun sens, il n'est pas valide.

Nous avons donc :

- vérifié la validité du dosage,
- calculé le titre par la méthode statistique,
- estimé les limites de confiance.

Dans le cas du dosage de la phénylalanine les données de l'essai sont résumées dans le tableau n° I4.

TABLEAU n° I4

	E_1	E_2	E_3	X_1	X_2	X_3	
Réponses y	I7 I9 I6 I7 I7 I8 I7 I8 I9	23 24 23 25 23 24 23 24 25	29 30 27 28 26 29 28 29 29	I8 I8 I6 I7 I7 I7,5 I7 I7,5 I7,25	24 23 24 2I 2I,25 23,5 23 2I,5 23	28 28 26 27,5 27 30 30 29 26	
Td	I58	2I4	255	I55,25	204,25	25I,5	
R	3	2	3	2	2	4	$\sum R = I7$
Coefficients x_i pour							$\sum x_2 Td$
a) différence étalon-échantillon	-I	-I	-I	I	I	I	Ta = - I6
b) pente combinée	-I	0	I	-I	0	I	Tb = I93,25
ab) manque de parallélisme entre les droites	I	0	-I	-I	0	I	Tab = 0,75
c) courbure des courbes combinées	I	-2	I	I	-2	I	Tc = -I6,75
ab) courbure opposée des pentes séparées	-I	2	-I	I	-2	I	Tac = I3,25

Les coefficients x_i sont ceux indiqués dans la table XVIII pour un essai factoriel 3,3. Ils sont appliqués aux Td de l'étalon et de l'échantillon.

VALIDITE du DOSAGE

Pour que l'essai soit valide, il faut que les sommes des produits $\sum x_i T_d$, à l'exception de la somme des produits T_b correspondant à la pente, qui doit être hautement significative, ne diffère pas significativement de 0, pour une probabilité donnée, $P = 0,05$ par exemple. Nous avons adopté la méthode simplifiée de J. PHILIPPE (27 p 275) pour vérifier cette validité.

On trouve dans la table XIX les valeurs de $t_a, t_b \dots$ pour le type d'essai correspondant, (ici essai 3,3 avec 9 déterminations par dose). Ces valeurs multipliées par la somme des amplitudes $\sum R$ donnent les limites que ne doivent pas dépasser les valeurs calculées de $T_a, T_{ac} \dots$

$$\text{Ici } \sum R = 17$$

On compare donc :

$$\begin{aligned} T_a = -16 & \quad \text{à } t_a \sum R = 0,83 \times 17 = 14,11 \\ T_b = 193,25 & \quad \text{à } T_b \sum R = 0,68 \times 17 = 11,56 \\ T_{ab} = 0,75 & \quad \text{à } T_{ab} \sum R = 0,68 \times 17 = 11,56 \\ T_c = -16,75 & \quad \text{à } t_c \sum R = 1,17 \times 17 = 19,89 \\ T_{ac} = 13,25 & \quad \text{à } t_{ac} \sum R = 1,17 \times 17 = 19,89 \end{aligned}$$

T_a dépasse peu la valeur 14,11 signifie que l'hypothèse est peu éloignée de la réalité,

T_b , qui traduit l'existence d'une pente significative des droites étalon et échantillon combinées, est largement supérieur à la valeur limite, donc hautement significatif,

T_{ab} , qui traduit le parallélisme des deux droites, est très inférieur à la valeur limite,

T_c et T_{ac} , qui traduisent le manque de linéarité des deux droites, sont inférieurs à leurs valeurs limites.

L'essai peut être considéré comme valide.

CALCUL du TITRE par la METHODE STATISTIQUE

Le logarithme du titre en pourcentage est donné par la formule :

$$\begin{aligned} \log t \% &= 2 + 4/3 i \frac{T_a}{T_b} && i \text{ étant le log de la raison de la } \\ &= 1,9668 && \text{progression géométrique utilisée} \\ & && \text{dans la gamme de dilutions, ici} \\ & && i = \sqrt{2} = 0,301 \\ t &= 92,6 \% \end{aligned}$$

L'échantillon étant évalué à 1.500 mg/l renferme réellement :

$$\frac{1.500 \times 92,6}{100} = 1.389 \text{ mg/l, soit } 1,39 \text{ g/l}$$

LIMITES DE CONFIANCE

L'écart type du log du titre, désigné par s_M , peut être calculé grâce à la formule :

$$s_M = 4 i s \sqrt{18 (3 + 2 T_a^2 / T_b^2)} / 3 T_b$$

La variance de l'erreur expérimentale s peut être estimée à partir de la formule :

$$s = \bar{R} / d^2 \text{ ou } = \sum R / k d^2$$

$$\text{ici } s = 0,9539$$

$$s_M = 0,014515$$

Les limites de confiance du titre sont :

$$M' \pm t s_M, \quad t \text{ pour une probabilité de } 0,05 = 2$$

$$1,9668 + 0,029030 = 1,99583 \quad 99 \%$$

$$1,9668 - 0,029030 = 1,93777 \quad 86,6 \%$$

L'échantillon étant évalué à 1.500 mg/l :

$$\frac{1.500 \times 99}{100} = 1,485 \text{ mg/l}$$

$$\frac{1.500 \times 86,6}{100} = 1.299 \text{ mg/l}$$

soit : de 1,29 à 1,48 g/l.

La valeur obtenue par lecture directe sur la courbe étant 1,42 g/l se trouve bien dans ces limites.

2 - DOSAGE de la METHIONINE

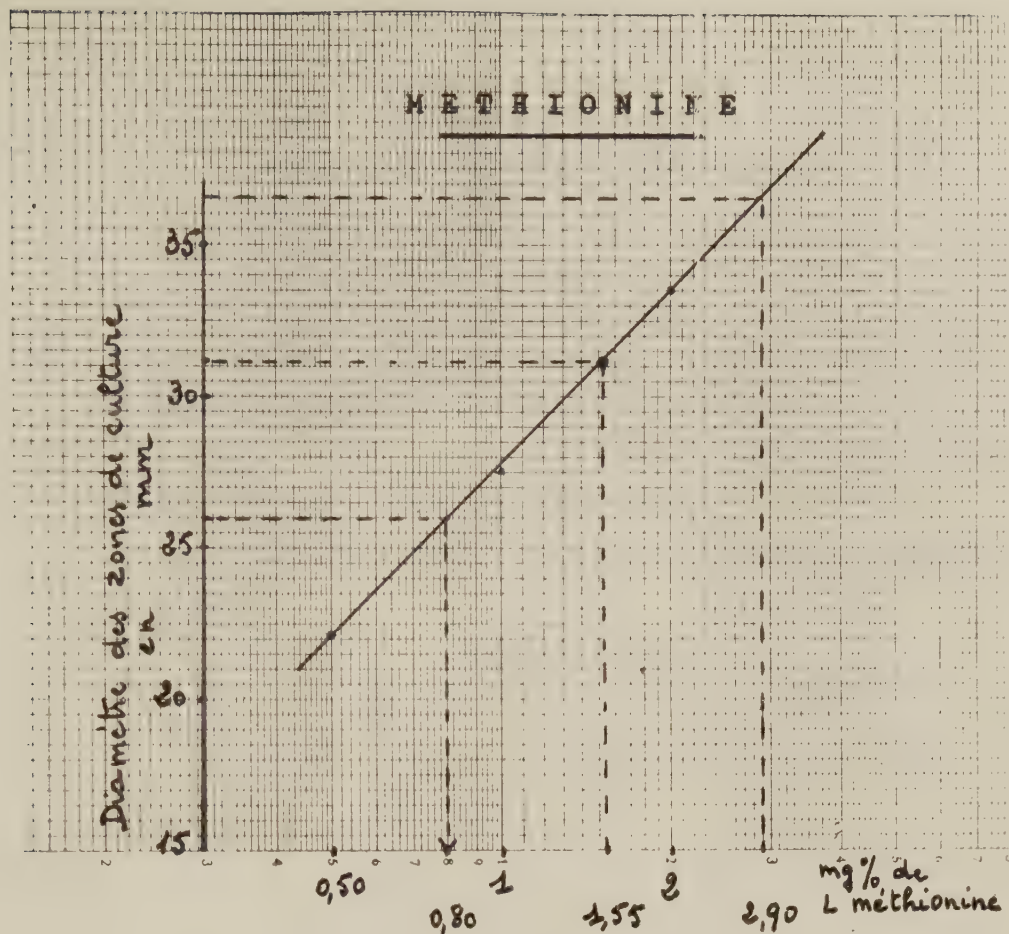
La mesure des diamètres des zones de culture obtenues dans les conditions indiquées a donné les résultats suivants avec les trois solutions étalons renfermant : 0,5, 1 et 2 mg % de L méthionine.

	E_1	E_2	E_3
	22	27	33
	22	27	32
	20	26	34
	24	26	35
	22	26	32
	22	28	33
	22	29	35
	23	29	35
	22	29,5	32
Moyennes :	22,1	27,5	33,4

Ces valeurs ont servi à établir la courbe d'étalonnage ci-dessous.

Le dosage de cet acide aminé dans le protéolysat choisi comme exemple, a donné les valeurs suivantes, en supposant la concentration en L méthionine égale à 1.500 mg pour 1.000 ml. La dilution au tiers a permis de préparer les dilutions supposées être à 0,50, 1 et 2 mg %.

	X_1	X_2	X_3
	28	33	36
	25	32,5	37
	27	30	36
	24	29,5	37
	26	31	36
	26	31,5	37
	25	31	36,5
	27	31,5	36
	26	31,5	37
Moyennes :	26	31.2	36,5



Les concentrations réelles sont donc les suivantes, en reportant directement ces valeurs sur la courbe étalon :

pour 0,50 mg% il y a réellement 0,80 mg% soit 160 % de la valeur théori.

pour 1 " " 1,55 mg% soit 155 % " "

pour 2 " " 2,90 mg% soit 145 % " "

Moyenne : 153,5 %

Le protéolysat était supposé renfermer 1.500 mg par litre, il renferme en réalité :

$$\frac{1.500 \times 153,5}{100} = 2.302,5 \text{ mg par litre soit } 2,30 \text{ g/l de L méthionine}$$

INTERPRETATION STATISTIQUE du DOSAGE :

L'hypothèse faite sur l'activité de l'échantillon est très éloignée de la réalité. On peut cependant vérifier la validité du dosage en éliminant la dose d'échantillon dont la réponse tombe hors de la gamme étalon. L'essai 3,3 devient alors un essai 3,2 dont les coefficients figurent également dans la table XVIII (J. PHILIPPE).

Les différentes données sont résumées dans le tableau n° 15

TABLEAU n° 15

	E _I	E ₂	E ₃	X _I	X ₂	
	22	27	33	28	33	
	22	27	32	25	32.5	
	20	26	34	27	30	
	24	26	35	24	29,5	
	22	26	32	26	31	
	22	28	33	26	31.5	
	23	29	35	25	31	
	23	29	35	27	31,5	
	22	29.5	32	26	31.5	
Td	I99	247,5	301	234	281,5	
R	4	3,5	3	4	3,5	$\sum R = 18$
Coefficient x _i pour :						$\sum x_i Td$
Différence étalon-échantillon	-2	-2	-2	3	3	Ta = 51,5
Pente combinée	-2	0	2	-1	1	Tb = 251,5
Manque de parallélisme entre les droites	1	0	-1	-2	2	Tab = -7
Courbure des courbes combinées	1	-2	1	0	0	Tc = 5

VALIDITE du TITRAGE

On compare :

Ta = 51,5

Tb = 251,5

Tab = -7

Tc = 5

à ta $\sum R = 1,86 \times 18 = 33,48$

à tb $\sum R = 1,07 \times 18 = 19,26$

à t_{ab} $\sum R = 1,07 \times 18 = 19,26$

à tc $\sum R = 0,83 \times 18 = 14,94$

(t_i valeurs trouvées dans la table XIX)

On voit que la différence entre échantillon et étalon (a) est toujours significative, mais le parallélisme des deux droites est satisfaisant ($T_{ab} < 19,26$), il n'y a pas de courbure significative ($T_c < 14,94$). La pente combinée des deux droites étalon et échantillon est très différente de 0 (T_b largement $> 19,26$).

L'essai est donc valide.

CALCUL du TITRE PAR METHODE STATISTIQUE

L'activité relative dans ce cas de dosage incomplet est donnée par la formule :

$$M' = c \cdot i \cdot T_a / T_b + i/2 \quad c = 5/6 \text{ (tableau XX) pour un essai } 3,2$$

$$\log t \% = 2 + 0,201856$$

$$t \% = 159 \%$$

L'échantillon étant évalué à 1.500 mg/l, sa concentration réelle est =

$$\frac{1.500 \times 159}{100} = 2.385 \text{ mg/l soit } 2,38 \text{ g/l}$$

Les limites de confiance de M' sont :

$$M' \pm K \cdot i \cdot \Sigma R / T_b \quad (K \text{ est trouvé dans la table XX})$$

$$\pm 0,033326$$

$$\begin{array}{ll} \log t \% \quad 2,201856 + 0,033326 = 2,235182 & 171 \% \\ \quad \quad \quad 2,201856 - 0,033326 = 2,16853 & 147 \% \end{array}$$

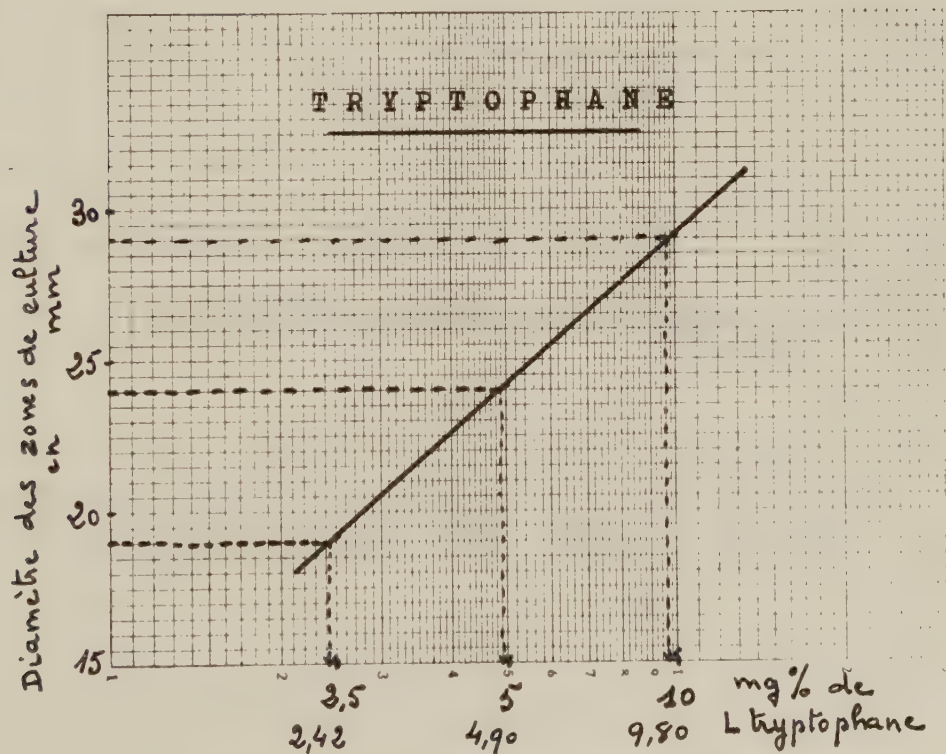
$$\text{de } 2,20 \text{ à } 2,56 \text{ g/l}$$

La valeur indiquée plus haut, trouvée par lecture directe sur la courbe étalon, 2,30 g/l, se trouve bien dans ces limites.

3 - DOSAGE du TRYPTOPHANE

La mesure des diamètres des zones de culture a donné les résultats suivants , avec des solutions étalons renfermant 2,5 5 et 10 mg % de L tryptophane :

	E_I	E_2	E_3
	20	24	28
	18	24	28
	20	25	29
	20	25	30
	19	25	30
	18	24	29
	20	24	29
	19	23	30
	20	23	29
Moyennes :	19,3	24,1	29,1



Le dosage de cet acide aminé dans le protéolysat a donné les valeurs suivantes, en supposant la concentration en L tryptophane égale à 500 mg/l. Les dilutions contenant :

2,5 5 et 10 mg % ont été préparées à partir du protéolysat pur.

X_1	X_2	X_3
I9	24	28
I9	24	28
I9	24	29
I9	25	30
20	24	30
I8	23	29
I8	23	29
20	25,5	30
I9	23,5	28
Moyenne I9	24	29

Les concentrations réelles sont donc les suivantes :

pour 2,5 mg%	il y a réellement 2,42	soit 96,8 % de la valeur théorique
pour 5	" "	4,90 soit 98 % " "
pour 10	" "	9,80 soit 98 % " "
Moyenne :		97,5 %

Le protéolysat était supposé renfermer 500 mg/l, il renferme en réalité :

$$\frac{500 \times 97,5}{100} = 487,5 \text{ mg/l, soit } 0,48 \text{ g/l de L tryptophane}$$

La validité de l'essai a été vérifiée avec la technique décrite pour le dosage de la phénylalanine, pour un essai 3,3. Le titre calculé est 0,49 g/l et les limites de confiance 0,46 à 0,51 g/l.

La valeur 0,48 g/l trouvée par la lecture directe sur la courbe étalon se trouve bien dans ces limites.

Cette méthode microbiologique décrite par R. LEIUC a donné des résultats qui sont très reproductibles. Sur les trois acides aminés que nous avons dosés, les dosages de la phénylalanine et du tryptophane ont permis d'obtenir des zones très nettes de culture ; avec la méthionine les zones étaient moins nettes, la concentration de l'inhibiteur demandant à être modifiée, ce que fait l'auteur actuellement du reste. Avec moins d'inhibiteur, l'inhibition de la multiplication bactérienne n'est que partielle et rend moins aisée la lecture des résultats, qui se trouve moins précise.

Pour obtenir une inhibition suffisante, il faut augmenter la concentration de l'inhibiteur, ce qui a pour conséquence, de diminuer la sensibilité de la méthode.

La précision est bonne mais cependant variable d'un acide aminé à l'autre. Dans le cas de zones très nettes, comme celles obtenues avec le tryptophane et la phénylalanine, il est possible d'apprécier le diamètre à 0,25 mm près, dans le cas de la méthionine la netteté du contour rend la précision de la lecture moins bonne. Cependant les concentrations d'acide aminé utilisées dans ce cas rendraient le dosage de la méthionine plus précis que celui du tryptophane, pour lequel la souche n'est sensible qu'à des concentrations nettement plus élevées.

C - COMPARAISON des RESULTATS OBTENUS avec les TROIS
TECHNIQUES DECRITES.

Nous donnons, ci-dessous, les résultats obtenus dans l'étude de sept échantillons qui sont différents de ceux précédemment étudiés. En effet, nous avons choisi non seulement des protéolysats, dont plusieurs correspondent à des lots différents d'une même spécialité, mais des solutions anabolisantes commercialisées dont la composition est connue.

Pour éviter la confusion avec les échantillons précédents, nous avons choisi de représenter chacun d'eux par une lettre (de a à g).

a) Comparaison des résultats obtenus avec la méthode microbiologique d'ADRIAN et la méthode physico-chimique de MOORE et STEIN automatisée.

Un protéolysat, lot a, dont les huit acides aminés essentiels ont été dosés par la méthode d'ADRIAN, a été étudié par chromatographie. Les résultats obtenus sont les suivants :

	<u>Méthode microbiol. d'ADRIAN</u>	<u>Méthode physico-chimique de MOORE et STEIN</u>
	en grammes par litre :	
Thréonine	1,95	2,01
Valine	2,89	2,49
Méthionine	1,15	2,33
Isoleucine	1,80	1,47
Leucine	2,48	2,54
Phénylalanine	0,92	0,82
Lysine	1,79	1,82
Tryptophane	0,50	0,95

Un premier examen de ce tableau montre que les résultats obtenus avec les deux techniques sont comparables, sauf pour deux acides aminés, la méthionine et le tryptophane pour lesquels les valeurs trouvées avec la méthode microbiologique sont environ deux fois moins élevées que les quantités obtenues par la méthode physico-chimique.

Ceci s'explique facilement : le protéolysat étudié est enrichi en méthionine et en tryptophane (fait qui est indiqué par le fabricant); ces acides aminés se trouvent donc sous la forme DL qui est dosée par la méthode physico-chimique alors que seules les formes L sont dosées par la méthode microbiologique.

Pour quatre des acides aminés étudiés ici, la différence entre les résultats obtenus avec chacune des techniques est inférieure à 3 % : thréonine, leucine, lysine et méthionine (1,15 de L méthionine ou 2,30 de DL méthionine avec la méthode d'ADRIAN, 2,33 avec la méthode physico-chimique). Pour le cinquième acide aminé, le tryptophane, 5 % de différence existe entre les résultats, ce qui est encore bon. Dans le cas des trois autres acides aminés la valine, la phénylalanine et l'isoleucine, les différences sont plus importantes, 12 à 14 % dans le cas des deux premiers et surtout 22 % dans le cas de l'isoleucine. Dans le cas de ce dernier acide aminé la valeur nettement plus forte obtenue par la méthode microbiologique peut s'expliquer par l'interférence possible de la leucine et de l'isoleucine. Il semble que la souche bactérienne utilisée soit strictement dépendante de la leucine, mais il est possible que la présence de leucine dans le milieu de culture interfère dans le dosage de l'isoleucine. Nous avons vu plus haut que la méthode microbiologique de LELUC n'est pas applicable au dosage de ces deux acides aminés, lorsqu'ils se trouvent tous les deux dans le même protéolysat.

Sur un protéolysat, lot b, quatre acides aminés ont été dosés par les deux méthodes, les résultats sont les suivants :

	Méthode microbiol. d'ADRIAN	Méthode physico-chimique de MOORE et STEIN
	en grammes par litre	
Phénylalanine	0,38	0,43
Leucine	3,45	3,17
Lysine	3,88	3,41
Tryptophane	0,32	0,60

Il y a dans ce cas de 6 à 13 % de différence entre les résultats obtenus avec les deux techniques. Dans le cas du tryptophane, il s'agit encore d'un protéolysat enrichi en tryptophane sous la forme DL (0,32 sous forme L ou 0,64 sous forme DL).

b) Comparaison des résultats obtenus avec la méthode microbiologique de LELUC et la méthode physico-chimique de MOORE et STEIN.

Avec la méthode microbiologique de LELUC trois acides aminés peuvent être dosés : la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane.

- cas de la Méthionine

Les résultats suivants ont été obtenus :

	méthode physico-chimique de MOORE et STEIN	Méthode microbiol. de LELUC
	en grammes par litre	
lot c	1,95	1,30
d	2,18	1,20
e	1,93	1,30
f	0,64	0,62
g	1,02	0,68
h	2,26	1,96

Dans quatre cas sur six les quantités de méthionine dosées avec la méthode microbiologique de R. LELUC sont nettement inférieures à celles obtenues par la méthode physico-chimique automatisée. Il s'agit avec les lots c, d et e de protéolysats enrichis en méthionine (indication donnée par le fabricant). Le dosage microbiologique dose 60 % environ de la quantité dosée par la voie physico-chimique. Deux explications peuvent venir à l'esprit : la souche bactérienne utilise une certaine quantité de la forme racémique de la méthionine ou bien ces protéolysats renferment, avant la surcharge, une petite quantité de méthionine naturelle qui a échappé à l'hydrolyse.

La première hypothèse paraît confirmée par l'analyse du lot g, qui est une solution synthétique d'acides aminés qui renferme, suivant la formule indiquée par le fabricant, 1,10 g/l de DL méthionine, la méthode microbiologique indique 0,68, c'est à dire 60 % du taux théorique, alors que la méthode physico-chimique donne 1,02 g/l (93 % du chiffre théorique)

Dans le cas du lot f les résultats sont très voisins : 0,62 et 0,64 g/l, ce qui indique la présence de L méthionine dans ce protéolysat et l'absence totale de forme racémique.

Dans le cas du lot h la différence est d'environ 15 % entre les résultats donnés par les deux méthodes. Il s'agit ici encore d'une solution synthétique qui renferme théoriquement 2,20 g /l, la méthode physico-chimique indique 2,26 g/l c'est à dire 3 % environ de plus et la méthode microbiologique de LELUC 1,96 g/l c'est à dire 12 % de moins que le chiffre théorique.

- cas de la phénylalanine

Les résultats obtenus sont les suivants :

	méthode physico-chimique de MOORE et STEIN	méthode microbio de R. LELUC
	en grammes par litre.	
lot b	0,43	0,38
c	0,57	0,56
d	0,80	0,68
e	0,86	0,86
f	1,45	1,28
g	1,10	1,08

L'examen de ces résultats montre que, dans trois cas sur six, les valeurs obtenues sont très voisines (moins de 2 % de différence). Dans deux cas, lot b et f, la différence est de 10 à 12 % et dans le cas du lot d elle est de 15 % . Il peut s'agir ici de protéolysats enrichis avec une petite quantité de forme racémique de phénylalanine, mais il est difficile de l'affirmer, aucune

indication n'étant donnée par les fabricants.

- cas du tryptophane.

Les résultats obtenus sont les suivants :

	méthode physico-chimique de MOORE et STEIN	méthode microbiol. de R. LELUC
	en grammes par litre.	
lot b	0,60	0,33
c	0,97	0.42
d	1,03	0.46
e	0,98	0.42
f	0,085	0,095
g	0,77	0,47

Il apparaît ici que tous les protéolysats (sauf le lot f, qui ne renferme que quelques traces de tryptophane ayant échappé à l'hydrolyse) sont enrichis en tryptophane sous forme racémique (ce qui est indiqué du reste par les fabricants). Les lots c, d et e sont enrichis théoriquement avec 1 g/l de DL tryptophane, le dosage physico-chimique indique donc ce résultat à 3 % près, tandis que le dosage microbiologique de LELUC dose 42 à 46 % de la quantité théorique. Les taux obtenus, en général, d'après ces résultats, par la méthode microbiologique de LELUC correspondent à 43 à 61 % des taux obtenus par voie physico-chimique. Le lot g est une solution synthétique qui renferme théoriquement 0,80 g/l de DL tryptophane, le dosage physico-chimique indique 0,77 c'est à dire 96 % de la concentration théorique et le dosage microbiologique 0,47 g/l c'est à dire 59 % de la concentration théorique.

c) Comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes microbiologiques.

Quelques essais seulement ont été faits ; ils permettent de mettre en évidence une assez bonne correspondance entre les résultats obtenus avec ces deux méthodes.

<u>Phénylalanine</u>	<u>méthode d'ADRIAN</u>	<u>méthode de LELUC</u>
	en grammes par litre	
lot a	0,92	0,88
b	0,38	0,38
d	0,67	0,68
f	1,53	1,28

Dans le cas de la phénylalanine un seul résultat paraît discordant selon les méthodes, celui obtenu avec le lot f qui donne 1,53 g/l avec la méthode d'ADRIAN et 1,28 avec la méthode de LELUC.

<u>Tryptophane</u>	<u>méthode d'ADRIAN</u>	<u>méthode de LELUC</u>
	en grammes par litre	
lot a	0.50	0.46
b	0,34	0,33

Dans le cas du lot a, le protéolysat est annoncé comme étant rechargé en tryptophane à raison de 1 g/l de la forme racémique. La méthode d'ADRIAN met 100 % de cette quantité théorique en évidence tandis que la méthode de LELUC n'en dose que 92 %, puisqu'il a déjà été dit plus haut que les méthodes microbiologiques ne dosent que la forme L des acides aminés.

Conclusion

Les méthodes microbiologiques permettent de doser la forme L des acides aminés, cette forme étant celle qui est utilisable par les microorganismes. Il apparaissait très important jusqu'alors de connaître la concentration des protéolysats injectables en forme L des acides aminés, forme qui était tenue comme la seule utilisable par l'organisme humain. Ce souci ne paraît plus majeur, comme nous l'avons vu plus haut, cependant les auteurs ne paraissent pas d'accord sur ce point.

A côté de cet avantage, qui garde cependant une certaine importance, les méthodes microbiologiques ont l'inconvénient d'exiger un travail long et délicat, surtout en ce qui concerne la méthode d'ADRIAN. Cette méthode permet le dosage de huit acides aminés (onze en utilisant des souches bactériennes différentes); chaque acide aminé exige un dosage qui porte sur 48 heures. Les souches bactériennes dépendantes exigent un entretien particulier quant au milieu de conservation, avec des réensemencements hebdomadaires, sinon elles deviennent vite inutilisables. Avec la méthode de R. LELUC, qui est beaucoup plus facile à mettre en oeuvre, il est possible de doser trois acides aminés seulement, méthionine, phénylalanine et tryptophane, le dosage de l'histidine étant rendu impossible par la difficulté de se procurer l'inhibiteur non commercialisé; celui de la lysine est peu sensible, celui de la leucine, rendu impossible par la présence de l'isoleucine dans les protéolysats. Cette méthode mériterait pourtant d'être étendue à d'autres acides aminés.

La méthode physico-chimique automatisée, si elle a l'inconvénient d'exiger, au départ, un matériel important, permet de doser tous les acides aminés essentiels ou non en un seul dosage qui dure 21 heures 30. Elle a l'inconvénient de doser forme L et forme racémique sans différenciation possible, mais elle a l'énorme avantage de donner, par un seul dosage des renseignements précieux sur la composition complète des protéolysats.

En effet, il apparaît qu'en dehors des acides aminés essentiels, un certain équilibre en acides aminés non essentiels est nécessaire dans la composition des protéolysats injectables. Certains acides aminés ne sont pas désirables en trop forte quantité, comme les acides aspartique et glutamique, qui seraient en partie responsables de l'apparition des nausées et des vomissements, tandis qu'une forte proportion en glycine peut être tolérée, car, à lui seul, cet acide aminé serait capable d'assurer plus de 40 % des besoins azotés spécifiques des malades en état de dénutrition (9).

Pour la bonne connaissance de la composition d'un protéolysat injectable, l'idéal serait d'effectuer un dosage physico-chimique automatisé donnant les concentrations des vingt acides aminés naturels qui s'y trouvent généralement; puis d'effectuer un dosage microbiologique sur certains acides aminés essentiels, lysine, thréonine, leucine, isoleucine, et peut être méthionine et phénylalanine, afin de vérifier que ceux-ci se trouvent bien sous la forme L utilisable.

2ème PARTIE

ETUDE DES PEPTIDES DANS LES PROTEOLYSATS INJECTABLES

Les résultats obtenus par dosage des acides aminés libres dans les protéolysats injectables du commerce nous ont montré qu'une partie, d'importance très variable, de l'azote se trouvait sous forme d'acides aminés libres ; le reste étant sans doute sous forme de polypeptides.

Dans cette seconde partie de notre travail, nous avons voulu :

- d'une part, vérifier la présence de ces peptides,
- d'autre part, les séparer des acides aminés libres, afin de doser séparément l'azote se trouvant sous chacune de ces formes. En effet, il est intéressant de connaître l'importance de la fraction contenant les acides aminés libres par rapport au protéolysat total puisque c'est cette fraction qui est directement assimilable par l'organisme.

CHAPITRE I

MISE en EVIDENCE des PEPTIDES

Nous avons vérifié la présence des peptides dans les échantillons de protéolysats déjà étudiés de deux manières différentes :

- 1° - en soumettant chaque échantillon à une hydrolyse complémentaire totale et en analysant ensuite les acides aminés,
- 2° - par chromatographie avec l'autoanalyseur à deux circuits : l'un normal, l'autre comportant une hydrolyse complémentaire. ;

1° - Analyse des protéolysats après hydrolyse complémentaire totale.

L'hydrolyse a été faite en présence d'acide chlorhydrique 6 N pendant 24 heures à 105°C en tubes scellés sous azote. Dans le cas de l'échantillon IV, ce temps n'étant pas suffisant pour obtenir une hydrolyse complète, nous avons prolongé cette opération pendant 48 heures.

Après évaporation sous vide, le résidu était repris par de l'acide chlorhydrique N/10, et l'analyse des acides aminés effectuée avec un autoanalyseur, d'après la méthode précédemment décrite.

Les résultats obtenus avec chacun des quatre échantillons les plus riches en peptides sont indiqués dans le tableau n° 16

Les résultats, exposés dans ce tableau, montrent que la totalité de l'azote se trouve sous forme d'acides aminés après l'hydrolyse poussée des échantillons ; en effet, nous avons indiqué, au bas du tableau, d'une part la quantité d'azote correspondant aux acides aminés dosés, et calculée d'après les teneurs indiquées pour chaque acide aminé, et, d'autre part, la quantité d'azote dosée par la méthode de Kjeldahl.

Ces valeurs sont très voisines, (moins de 6 % d'écart) comme l'indique la dernière ligne du tableau.

Ces résultats confirment bien, comme nous le supposions, que la fraction, que nous n'avions pas dosée sous forme d'acides aminés libres dans les protéolysats, se trouve sous forme peptidique. Ces résultats confirment également, si besoin était, la qualité de la méthode physico-chimique automatisée, puisque la différence entre les teneurs en azote calculées d'après cette méthode et les teneurs en azote déterminées avec la technique de KJELDAHL, est toujours égale ou inférieure à 5 %, et même, dans deux cas, égale à 0,3 et 0,7 %.

TABLEAU n° 16

COMPOSITION en ACIDES AMINES APRES HYDROLYSE
COMPLEMENTAIRE TOTALE des PROTEOLYSATS.

en grammes par litre

	I	II	III	IV
Ac. cystéique	0	0	0	0
Ac. aspartique	1.90	3.98	1.16	3.87
Thréonine	1.09	1.67	1.06	1.66
Sérine	1.35	2.43	0.97	1.97
Ac. glutamique	5.47	8.84	4.97	6.10
Proline	3.72	5.54	3.39	1.82
Glycine	0.50	0.85	0.45	0.63
Alanine	0.96	1.49	0.89	1.97
Valine	1.98	3.16	1.47	2.01
Cystéine	0	0	0	0
Méthionine	0	0.34	0.29	0.52
Isoleucine	1.49	2.53	1.13	1.94
Leucine	2.61	4.22	1.96	3.99
Tyrosine	0.081	0.51	0.22	0.15
Phénylalanine	1.41	1.90	0.51	0.83
Ornithine 2 ClH	traces	1.01	0.30	0.26
Lysine ClH	2.59	4.12	2.45	3.87
Histidine ClH	0.74	1.45	0.96	0.82
Tryptophane	traces	0	0	0
Arginine ClH	1.07	1.81	0.92	1.01
NH3	0.62	1.15	0.71	0.71
N total (ac. aminés + NH3)	3.94	6.66	3.51	5.43
N total Kjeldahl	4.10	6.60	3.72	5.45
Différence en %	4 %	0,9 %	5,6 %	0,3 %

2° - Mise en évidence des peptides avec l'autoanalyseur
à deux circuits.

Le principe de cette recherche est le suivant : la chromatographie de l'échantillon se fait sur la même colonne de résine cationique (chromobeads A Technicon) dans les conditions décrites plus haut pour le dosage des acides aminés. A la sortie de la colonne l'éluat de chromatographie est, à chaque instant, divisé par moitié et envoyé dans deux circuits différents. Le premier circuit comporte une hydrolyse alcaline puis la réaction classique à la ninhydrine pour mettre en évidence les acides aminés libérés. Le second circuit permet la mise en évidence directe des acides aminés par la même réaction de MOORE et STEIN. L'enregistrement des résultats des deux circuits est synchronisé, la partie non hydrolysée étant retardée par passage dans une "tobine retard" qui permet l'enregistrement au même instant de leurs résultats respectifs. La présence d'un acide aminé libre se traduit par deux pics de même hauteur alors qu'un peptide donne un pic plus important après hydrolyse qu'avant, la densité optique après hydrolyse variant en fonction du nombre d'acides aminés constituant ce peptide.

Réactifs utilisés

- solution de soude à 18 % pour l'hydrolyse
- acide pour neutralisation :

Acide acétique	800 ml
Eau	800 ml
Tampon acétate de sodium	
pH 5,5	250 ml
Brij 35 en sol. à 30 %	5 ml

- diluant :

Tampon acétate de sodium pH 5,5	1 volume
Eau	3 volumes
Brij 35 en sol. à 30 %	10 ml
pH 5,4 avec la soude 4 N	

- réactif à la ninhydrine :

Ninhydrine	20 g
Hydrindantine	1,5 g
Méthylcellosolve pur	650 ml
Tampon acétate pH 5,5	350 ml
Méthylcellosolve dilué à 1/2	2 l.

PROTOCOLE D'UN ESSAI

Avant de placer l'échantillon sur la colonne de résine les réactifs sont introduits dans le système analytique afin de régler l'enregistrement de la ligne de base. La vitesse de la pompe proportionnante est réglée à 2,5 tours minute (au lieu de 4 tours pour le dosage des acides aminés) afin d'obtenir une durée de séjour de 70 minutes dans le bain-marie d'hydrolyse.

L'échantillon, dont le volume est calculé comme nous l'indiquerons plus loin, est placé sur la colonne et l'élution mise en route comme il a été indiqué plus haut. L'autograde est préparé avec les mêmes tampons que pour le dosage des acides aminés, afin de réaliser le même gradient de pH.

Le schéma de l'essai est résumé dans le diagramme ci-joint.

A la sortie de la colonne, l'éluat de chromatographie est divisé à chaque instant et envoyé dans deux circuits :

- La première partie est introduite dans le circuit analytique par le tube de pompe n° 2 (CPV tygon diam. int 0,025 pouce), fractionnée en parties aliquotes par de l'azote arrivant dans le circuit grâce au tube de pompe n° 4 (CPV tygon diam. int. 0,025 pouce). De la soude est ajoutée par le tube n° 13 (CPV spécial daim. int. 0,045 pouce). Le mélange se fait dans une bobine avant le passage dans un bain-marie réglé à 98°C dans lequel se fait l'hydrolyse pendant 70 minutes.

A la sortie de cet appareil, après passage dans une bobine de refroidissement, le liquide est repompé par le tube n° 1 (CPV tygon diam. int. 0,073 pouce). Après élimination du gaz dans un "débulleur", l'échantillon hydrolysé est repompé par le tube n° 12 (tygon diam. int. 0,048 pouce) fragmenté par de l'azote (tube de pompe n° 10 CPV tygon diam. int. 0,040 pouce) et neutralisé (la solution d'acide acétique est introduite par le tube de pompe n° 11 en "acidflex", diam. int. 0,040 pouce). Après mélange, le réactif à la ninhydrine est ajouté, et la coloration développée par passage dans un bain-marie; une bobine permet le refroidissement du liquide avant son passage dans le colorimètre n° 1.

- Le second circuit reçoit l'éluat de chromatographie par le tube de pompe n° 8 (CPV tygon diam. int. 0,020 pouce). L'échantillon est fragmenté par de l'azote grâce au tube de pompe n° 6 (CPV tygon diam. int. 0,040 pouce), puis dilué par le tampon acétate (tube de pompe n° 7 CPV solvaflex diam. int. 0,056 pouce) pour l'amener à la même concentration que l'échantillon hydrolysé après addition des différents réactifs.

Enfin, le réactif à la ninhydrine est ajouté par le tube de pompe n° 9 (CPV tygon diam. int. 0,045 pouce). Le mélange est fait dans une bobine avant passage dans un bain-marie à 95° C pendant 20 minutes. A la sortie de cet appareil, le liquide passe dans une "bobine de retard" dont la longueur est calculée pour permettre l'arrivée dans le colorimètre n° 2 de la fraction correspondante à celle arrivant simultanément dans le colorimètre n° 1.

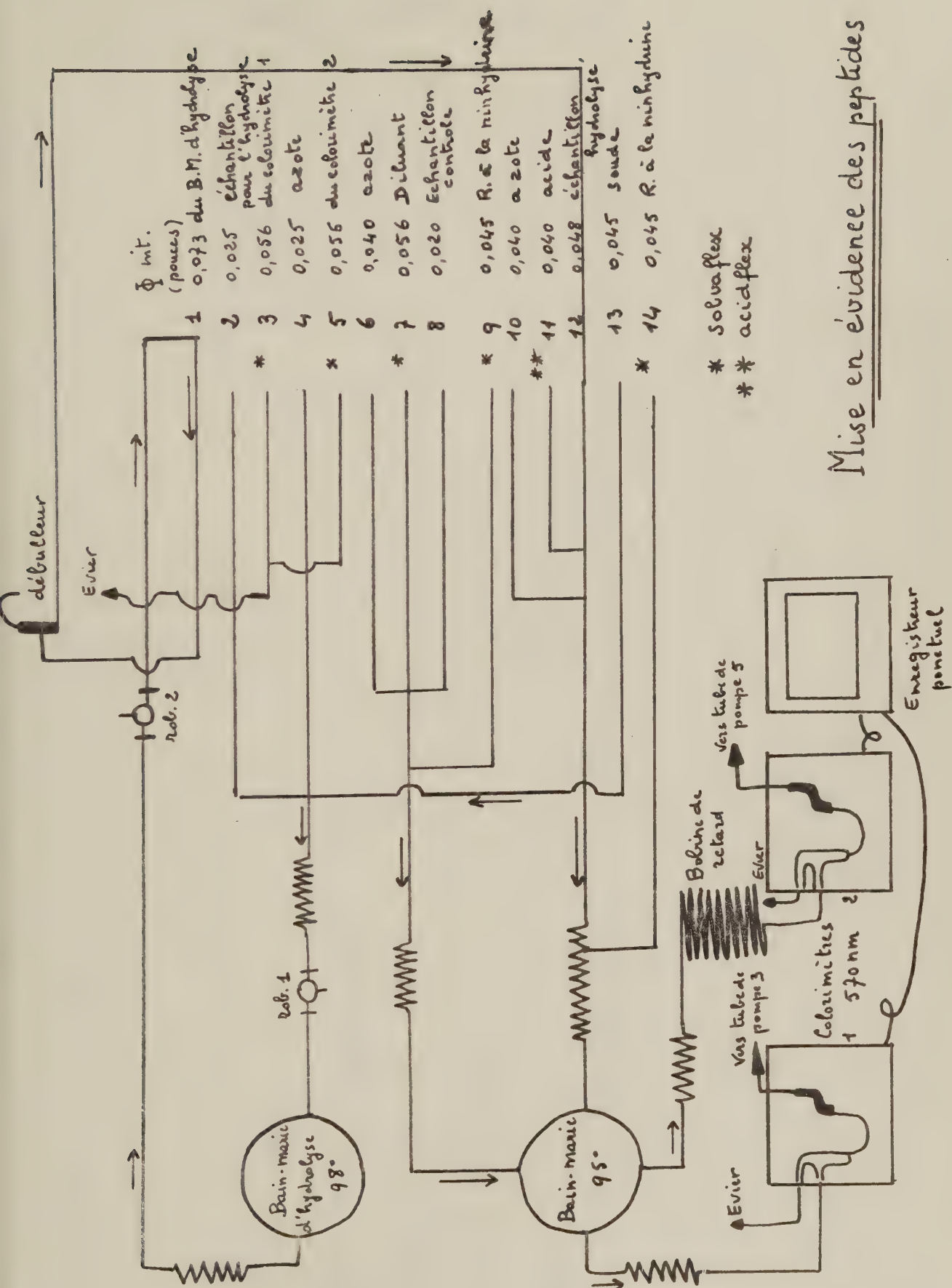
Cette synchronisation des deux circuits permet l'enregistrement au même instant de la coloration obtenue avec et sans hydrolyse de chaque partie aliquote d'éluat de chromatographie.

Après passage dans les colorimètres, le liquide de chaque circuit est repompé par les tubes n° 3 et 5 et rejeté vers l'évier.

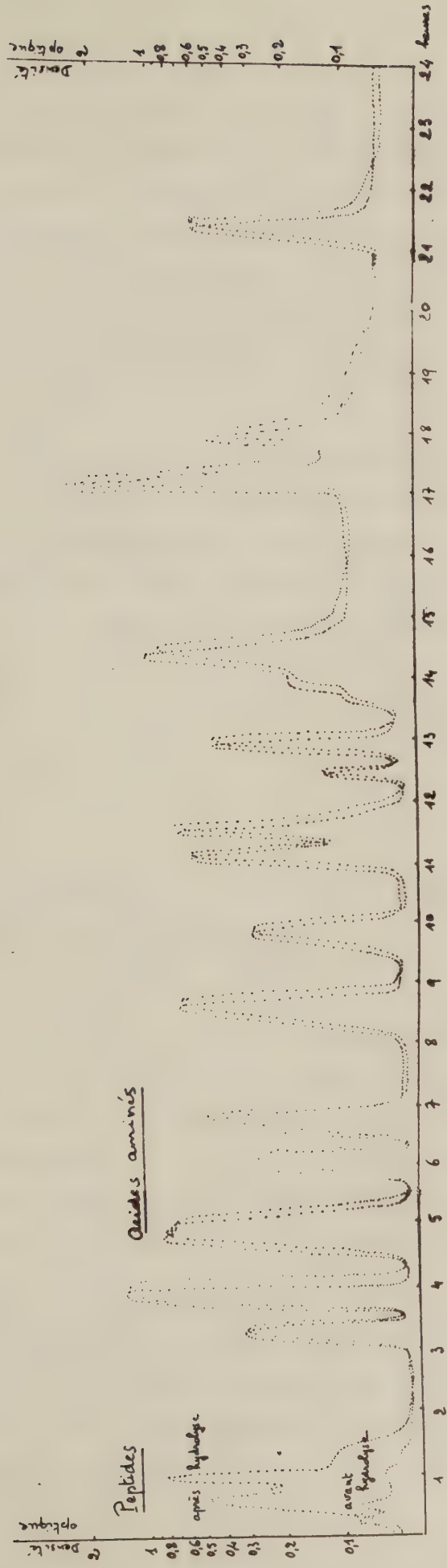
Les deux robinets à trois voies (rob. n° 1 et rob. n° 2) permettent d'isoler la bobine d'hydrolyse pour son lavage.

RESULTATS

Les chromatogrammes obtenus avec chacun des six protéolysats étudiés, nous ont montré que les peptides peuvent être mis en évidence dans les 90 premières minutes de l'élution et, qu'après ce temps, tous les pics correspondent à des acides aminés libres. Nous donnons, ci-joint, la reproduction d'un chromatogramme entier (échantillon n° II). Dans les schémas suivants nous n'avons fait figurer que le début des chromatogrammes, c'est à dire la partie correspondant aux peptides, afin de comparer l'importance de la fraction peptidique dans les six échantillons étudiés.



Mise en évidence des peptides



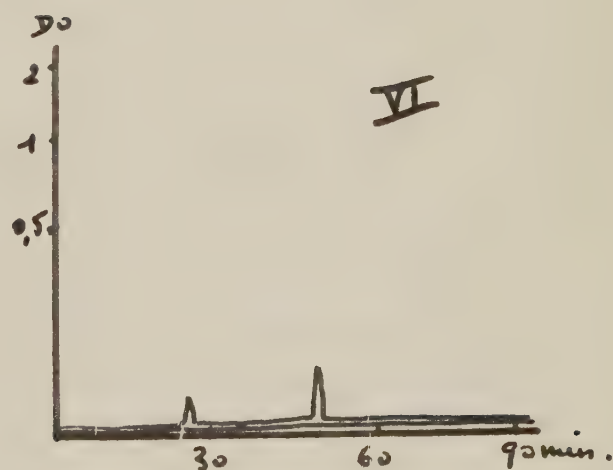
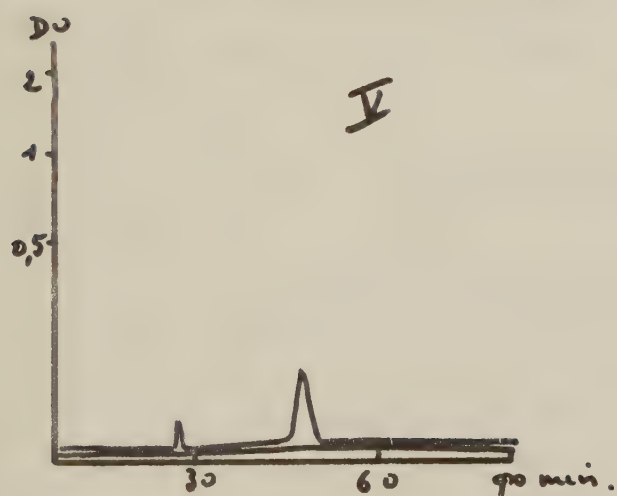
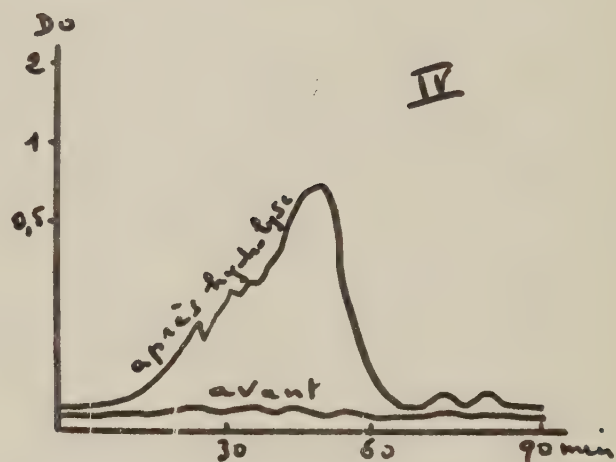
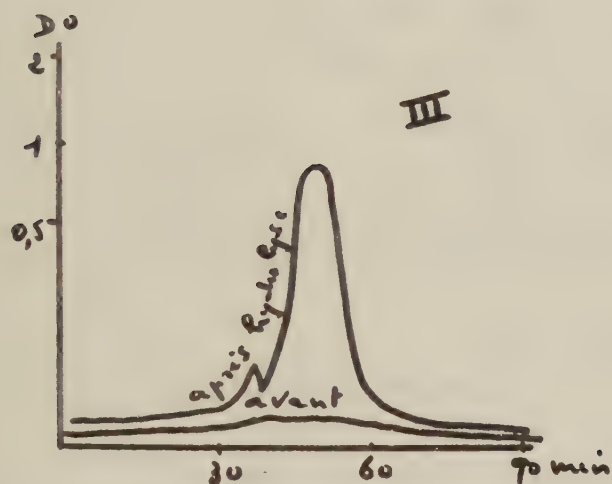
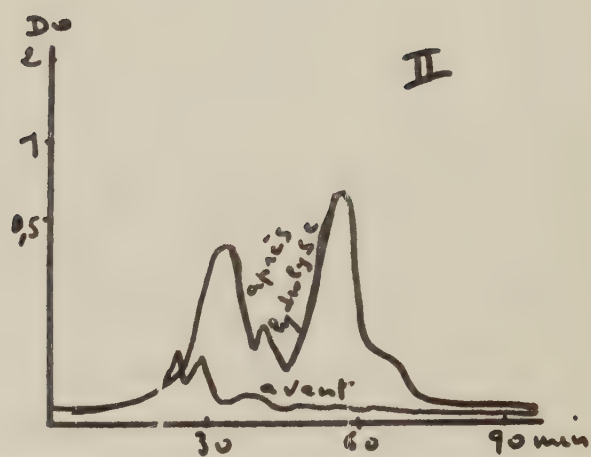
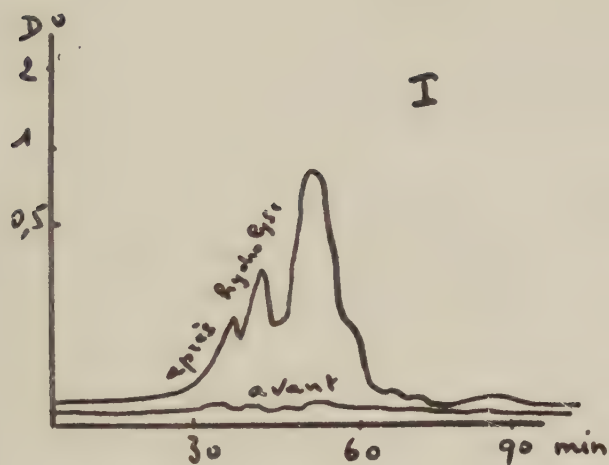
Afin de pouvoir faire cette comparaison, nous avons déterminé la quantité de chaque échantillon à déposer sur la résine en fonction de la quantité totale d'azote du protéolysat. Après quelques essais préalables, nous avons fixé à 0,15 mg la quantité d'azote à utiliser dans la prise d'essai, quantité qui nous permettait d'obtenir, après hydrolyse des échantillons les plus riches en peptides, une coloration restant dans les limites de sensibilité de l'appareil.

La dilution de chaque échantillon est effectuée dans de l'acide chlorhydrique N/10 afin d'obtenir une prise d'essai correspondant à cette quantité d'azote. Le volume des prises d'essai est donc le suivant :

échantillon n° 1	0,336 ml	de solution au 1/10
2	0,227 ml	"
3	0,403 ml	"
4	0,275 ml	"
5	0,410 ml	"
6	0,254 ml	"

(La prise d'essai déposée sur la résine est toujours mesurée avec une micropipette).

Les schémas, ci-dessous, montrent que, dans le cas des échantillons I, II, III et IV, la coloration après hydrolyse est très importante. Avec l'échantillon III, il apparaît un petit pic, puis un très grand pic correspondant à une quantité importante d'acides aminés libérés par l'hydrolyse. Dans les protéolysats I, II et IV plusieurs pics, plus ou moins bien séparés et d'importance inégale, apparaissent successivement. Par contre pour les échantillons V et VI, il y a peu de différences avant et après hydrolyse, les petits pics obtenus sont peu significatifs. Ceci confirme bien ce que les dosages d'azote avaient laissé prévoir, à savoir la très forte proportion de peptides dans les échantillons I, II, III, et IV et leur présence à l'état de traces dans les protéolysats V et VI.



MISE EN EVIDENCE DES PEPTIDES AVEC L'AUTOANALYSEUR

CHAPITRE II

SEPARATION des PEPTIDES

En analysant les échantillons après hydrolyse complémentaire et en utilisant l'autoanalyseur muni d'un circuit d'hydrolyse, nous avons pu mettre en évidence la fraction de l'azote que nous n'avions pas dosée au cours du titrage des acides aminés libres, fraction qui se trouve bien sous forme peptidique. Il nous a paru alors intéressant de séparer ces deux fractions afin d'évaluer quantitativement l'azote correspondant à chacune d'elles.

Nous avons essayé plusieurs procédés :

- le premier qui venait à l'idée, d'après les résultats précédemment indiqués, obtenus avec l'autoanalyseur, était l'élution des peptides et la séparation de la fraction d'éluat correspondant aux 90 premières minutes de l'élution ;

- le second procédé que nous avons envisagé est l'utilisation de l'ultrafiltration sur membrane ;

- enfin, le troisième procédé, qui nous a donné entière satisfaction, est la séparation sur Séphadex dans des conditions bien précises que nous décrirons.

I - Séparation des peptides avec l'autoanalyseur

L'élution des peptides dans la première partie de l'éluat de chromatographie nous a incitée à isoler cette fraction peptidique en recueillant l'éluat au cours des 90 premières minutes. Nous nous sommes alors heurtée à plusieurs difficultés. Le dosage des acides aminés que nous voulions effectuer sur cette partie isolée, après hydrolyse des peptides, n'était pas réalisable sur l'éluat ; il fallait concentrer celui-ci, ce qui était rendu impossible par la présence du citrate de sodium qui précipite alors. La difficulté a été tournée en remplaçant les tampons citrate de sodium

par des tampons volatils pyridine-acide formique suivant la technique de PADIEU et MALEKNIA (26) modifiée par DELARUE (6).

Technique utilisant les tampons volatils

Réactifs pour la préparation de l'autograde

- Tampon pH 2,9 :

pyridine	8 ml
acide formique	20 ml
Eau Q.S.P.	1 litre.

- Tampon pH 4,25

pyridine	8 ml
acide formique	4,4 ml
eau Q.S.P.....	1 litre.

- Tampon pH 5,0

pyridine	80 ml
acide formique	26 ml
eau Q.S.P.....	1 litre.

le pH de ces trois tampons est ajusté avec de l'acide formique si nécessaire.

L'autograde comprend :

dans les chambres I à 5	tampon pH 2,9	
6	tampon pH 4,25	80 ml par chambre
7 à 9	tampon pH 5,0	

La résine utilisée est la même (chromobeads type A) transformée en sel de la base organique de la manière suivante :

- lavage avec une solution d'acide chlorhydrique 4 N
- lavage avec de l'eau bidistillée jusqu'à neutralité,
- lavage avec une solution de pyridine 2 N
- lavage avec de l'eau bidistillée jusqu'à neutralité.

La résine est alors placée sur la colonne et tassée par passage de la solution tampon pH 2,9.

PROTOCOLE d'ESSAI

Il est le même que celui décrit précédemment, à quelques détails près :

La température de départ de la chromatographie est de 40°C, elle est montée à 60° C après le passage de l'acide glutamique, soit 5 heures après le passage de l'acide cystéique.

Le débit de l'éluat reste réglé à 30 ml/ heure (contrairement à ce que préconise DELARUE 35 ml/h).

La régénération de la résine se fait par passage du tampon pH 5 qui termine l'élution, la résine est simplement remise en tampon pH 2,9 par passage de celui-ci pendant 2 H.

Le gradient de pH est réalisé dans le même autograde en matière plastique à condition de le laver à l'eau après chaque chromatographie, l'appareil en verre n'est pas nécessaire.

Le tube de prélèvement de l'échantillon et le tube de pompe tygon, généralement utilisés, sont remplacés par des tubes de même grosseur en "solvaflex".

Avec cette nouvelle technique, nous avons vérifié que les peptides sortaient à la même place dans le chromatogramme qu'avec les tampons citrate.

Nous avons procédé à la séparation de la fraction peptidique des quatre échantillons de protéolysat les plus riches en polypeptides. Par opération, nous mettions 0,5 ml de protéolysat sur la colonne, cinq opérations nous permettaient de grouper les cinq fractions de 45 ml d'éluat (= 90 premières minutes d'élution), ce qui nous donnait finalement un volume d'éluat de 225 ml correspondant à 2,5 ml de protéolysat pur.

Ces 225 ml de tampon pyridine-acide formique renfermant les peptides (et l'acide cystéique si le protéolysat en contenait), était concentrés par évaporation sous vide.

L'évaporation était poussée jusqu'à réduction à 1-2 ml qui étaient repris par de l'acide chlorhydrique N/10, évaporés à nouveau, puis repris une seconde fois dans les mêmes conditions et enfin, après évaporation, repris par de l'acide chlorhydrique N/10 et complétés à 2,5 ml de manière à reconstituer le volume du protéolysat.

Nous procédions alors à la vérification de la présence des peptides et de l'absence d'acides aminés libres dans cette fraction isolée, en utilisant l'autoanalyseur muni des deux circuits. Cette fraction peptidique était ensuite hydrolysée en présence de ClH 6 N, pendant 24 heures à 105°C, en tubes scellés sous azote.

L'hydrolyse était suivie d'une vérification de l'absence de résidu peptidique avec l'autoanalyseur. Si l'absence de peptides n'était pas totale l'hydrolyse était poursuivie.

Après évaporation du résidu d'hydrolyse et reprise par de l'acide chlorhydrique N/10, l'analyse quantitative des acides aminés était faite avec l'autoanalyseur en utilisant la méthode classique.

RESULTATS

Ayant ainsi opéré sur les quatre échantillons de protéolysats injectables, nous avons obtenu les résultats indiqués dans le tableau n° 17.

Dans ce tableau, le détail de la composition en acides aminés est indiqué qui nous permet de remarquer que, dans tous les cas, ce sont les acides aminés acides qui se trouvent en plus forte proportion.

En bas de ce tableau nous indiquons la quantité d'azote correspondant aux acides aminés et à l'ammoniaque de cette fraction. Nous redonnons également les valeurs déjà connues, à savoir la quantité de l'azote se trouvant dans la fraction contenant les acides aminés libres, puis le total de ces deux fractions, obtenu par addition des deux nombres précédents, enfin, la quantité totale d'azote déterminée par la méthode de Kjeldahl sur le protéolysat pur.

En comparant ces deux dernières valeurs nous pouvons voir qu'il manque encore une certaine quantité d'azote que nous avons indiquée pour chacun des protéolysats.

Cette quantité d'azote, qui varie de 0,80 à 1,90 g/l, selon les protéolysats, correspond à 19,5 % de l'azote total pour l'échantillon I, 22,5 % pour l'échantillon II, 33,8 % pour l'échantillon III et 34,8 % pour l'échantillon IV.

Il y a donc une partie des peptides qui ne se trouve pas dans la fraction isolée de la façon que nous venons de décrire.

Nous avons d'abord supposé que cette fraction contenant des peptides alcalins est retenue par la résine et pourrait être éluée par un tampon plus alcalin. Nous avons fait varier le pH du tampon d'élution sans résultat. D'autre part, en comparant les chiffres obtenus lors du dosage des acides aminés après hydrolyse poussée du protéolysat total et la somme de ceux obtenus dans les deux fractions isolées, acides aminés libres et peptides, nous nous sommes aperçue que les acides aminés dont il manque une certaine quantité sont encore des acides aminés acides.

TABLEAU n° 17

COMPOSITION de la FRACTION PEPTIDIQUE ISOLEE SUR
RESINE CHROMOBEADS A

en grammes par litre.

	I	II	III	IV
Ac. cystéique	0	0	0	0
Ac. aspartique	0,35	0.40	0.022	1,16
Thréonine	0.27	0,29	0.051	0.39
Sérine	0,29	0,61	0,055	0,33
Ac. glutamique	2,81	3.41	1,36	2.99
Proline	0,82	0,94	0,10	0,55
Glycine	0,12	0.13	0.012	0,17
Alanine	0,11	0,14	0,021	0,27
Valine	0,24	0,20	0,065	0,24
Cystéine	0	0	0	0
Méthionine	0,09	0,03	0	0,020
Isoleucine	0,15	0.22	0,028	0,20
Leucine	0,13	0,11	0,040	0,32
Tyrosine	0,035	traces	0	0,01
Phénylalanine	0,058	traces	0	0,026
Ornithine 2 ClH	0,10	0,08	0	0,086
Lysine ClH	0,044	0,042	0	0,09
Tryptophane	0	0	0	0
Histidine ClH	0,015	0,025	0	0,03
Arginine ClH	0	0	0	0
NH3	0,19	0,17	0,094	0,14
N (des ac. aminés + NH3 de cette fraction peptidiq.)	0,77	0,86	0,25	0,87
N des acides aminés libres	2,53	4,25	2.21	2.68
N total de ces 2 fractions	3,30	5,11	2.46	3,55
N Kjeldahl s/le prot. pur	4.10	6,60	3.72	5.45
manque encore	0,80	1.49	1.26	1.90
" en %	19,5	22,5	33,8	34,8

TABLEAU n° 18

	COMPOSITION du PROTEOLYSAT n° II				
	en grammes par litre.				
	I Acides Aminés libres	2 Ac.aminés de la fract. peptid. isolée	3 Total de I + 2	4 Ac.aminés après hydro- lyse complé- mentaire du protéol.tal.	5 Différence entre 3 et 4 = fraction non isolée.
Ac. cystéique	0,62	0	0,62	0	
Ac. aspartique	0,80	0,40	1,20	3,98	2,78
Thréonine	1,82	0,29	2,11	1,57	
Sérine	1,76	0,61	2,37	2,43	0,06
Ac. glutamique	3,34	3,41	6,75	8,34	2,09
Proline	1,70	0,94	2,64	5,54	2,90
Glycine	0,46	0,13	0,59	0,85	0,26
Alanine	1,15	0,14	1,29	1,49	0,20
Valine	2,21	0,20	2,41	3,16	0,75
Cystéine	traces	0		0	
Méthionine	1,14	0,03	1,17	0,34	
Isoleucine	1,78	0,22	2,00	2,53	0,53
Leucine	3,70	0,11	3,81	4,22	0,41
Tyrosine	0,33	traces	0,33	0,51	0,18
Phénylalanine	1,79	traces	1,79	1,90	0,11
Ornithine 2 ClH	0,045	0,08	1,125	1,01	
Lysine ClH	3,92	0,042	3,962	4,52	0,16
Tryptophane	1,27	0	1,27	1,45	0,18
Histidine ClH	traces	0,025	0,025	0	
Arginine ClH	1,78	0	1,78	1,81	0,03

Nous avons fait ces calculs pour les quatre protéolysats étudiés et nous donnons un exemple de ce calcul dans le tableau n° 18, exemple correspondant à l'échantillon n° 11.

Dans la colonne 1 sont indiqués les teneurs en acides aminés libres (déjà indiqués dans le tableau n° 7), dans la colonne 2 les quantités d'acides aminés isolées avec la fraction peptidique (déjà données dans le tableau n° 17), la colonne 3 est la somme de ces deux valeurs pour chaque acide aminé. Dans la colonne 4 sont indiquées les quantités d'acides aminés dosées après hydrolyse complémentaire poussée du protéolysat total (valeurs données dans le tableau n° 16). Enfin, dans la colonne 5 est indiquée pour chaque acide aminé, la différence entre 3 et 4, c'est à dire la quantité d'acides aminés qui doit encore se trouver dans une fraction peptidique que nous n'avons pas isolée. Ces résultats montrent qu'il manque surtout des acides aminés acides, acide aspartique, acide glutamique, et de la proline.

Il faut noter que la quantité de certains acides aminés est plus faible après hydrolyse complémentaire (colonne 4) qu'avant (colonne 3). Ce sont ceux qui supportent mal le chauffage dans ces conditions.

Nous avons alors cherché si les peptides pouvaient rester sur la résine, en effectuant des dosages d'azote sur un échantillon avant et après passage sur la colonne.

DOSAGE d'AZOTE par la METHODE de KJELDAHL AVANT et APRES PASSAGE SUR LA RESINE.

Il était impossible d'envisager des dosages d'azote sur le tampon pyridine-acide formique qui, même après évaporation, peut laisser persister des traces d'azote dans l'échantillon. Nous sommes donc revenue à la technique précédente utilisant les tampons citrate de soude, malgré la difficulté que cause la cristallisation de ce sel au cours de la minéralisation nécessaire au dosage par la méthode de Kjeldahl.

Les dosages d'azote ont porté sur la totalité du tampon d'élution après 22 H. 30 et les taux, dans le tableau n° 19, sont rapportés au litre de protéolysat pur en tenant compte de la dilution réalisée.

TABLEAU n° 19

DOSAGE de l'AZOTE PAR LA METHODE DE KJELDAHL AVANT ET APRES
PASSAGE SUR LA RESINE
en grammes par litre.

	avant passage	après passage
solution d'acides aminés	2,52	2,52
échantillon VI	5,91	5,84
" II	6,61	5,14

- Les expériences ont porté sur trois échantillons :
- le premier était une solution extemporanée d'acides aminés qui a permis de voir que la totalité des acides aminés est éluee,
 - le second était l'échantillon VI : le dosage d'azote après passage sur la résine a permis de retrouver 5,84 g/l alors que le protéolysat non traité en contenait 5,91 ; cette différence de 1,2 % reste dans les limites de la marge d'erreur expérimentale. L'échantillon II riche en peptides a laissé 22 % d'azote sur la colonne, la quantité retrouvée est de 5,14 g/l alors qu'il en renferme 6,61 g/l.

Cette expérience nous a montré qu'une partie des peptides reste sur la colonne de résine pour une raison que nous n'avons pas élucidée.

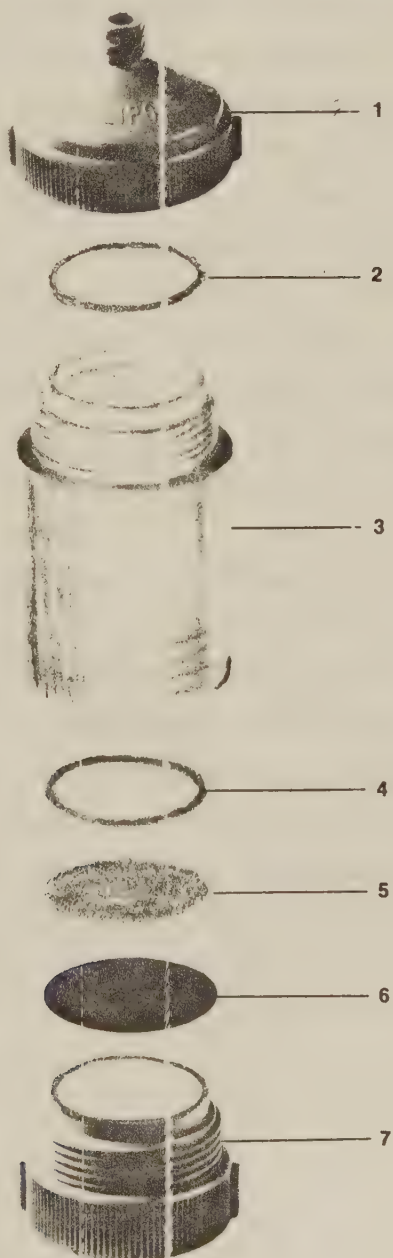
L'autoanalyseur nous permet donc de mettre en évidence une partie des peptides mais cette réaction n'étant pas quantitative, ce procédé est inutilisable pour séparer la fraction peptidique de façon rigoureuse.

II - Utilisation de la filtration sur membrane.

Nous avons cherché à séparer la fraction peptidique des protéolysats par ultrafiltration sur membrane en utilisant un appareil Millipore, la cellule UF - 25, équipée soit de membranes Pellicon PSAC, soit de membranes Diaflo UM2 ou UM 05, qui permettent une séparation moléculaire.

La cellule UF.25 dont le schéma est donné ci-dessous supporte une pression de 7 Kg/cm², nous n'avons jamais dépassé 4 kg/cm², pression qui nous permettait d'obtenir un débit suffisant.

- 1 - Couvercle Swinnex
- 2 - Joint
- 3 - Cylindre central
- 4 - Joint
- 5 - Membrane
- 6 - Grille-support
- 7 - Base Swinnex.



La membrane Pellicon du type PSAC est l'ensemble d'un polymère formant une pellicule extrêmement mince et d'un support constitué par un substrat poreux. Cette pellicule, c'est à dire la membrane proprement dite, est d'une épaisseur inférieure à 1 micron. Le substrat est une feuille poreuse constituée d'esters de cellulose d'une épaisseur d'environ 130 microns. Elle peut être conservée à sec, elle est neutre, elle a, d'après le fabricant, une capacité de rétention des molécules d'un poids moléculaire de 1.000.

Les membranes DIAFLO que nous avons utilisées sont du type UM qui séparent les molécules de faible poids moléculaire. La membrane UM2, de charge neutre, possède des pores qui arrêtent, d'après le fabricant, les molécules d'un poids moléculaire voisin de 1.000. La membrane UM 05, qui a une charge anionique négative, séparerait les molécules d'un poids moléculaire voisin de 500, mais d'une façon variable suivant le pH de l'échantillon.

Nous avons effectué nos essais avec l'échantillon I qui renferme une quantité importante de peptides. Le procédé est le suivant : 4 à 5 ml d'échantillon sont filtrés sur la membrane choisie ; les acides aminés et les peptides, ayant traversé le filtre, sont mis en évidence dans le filtrat avec l'autoanalyseur muni du circuit d'hydrolyse, et un dosage des acides aminés est effectué par la méthode habituelle.

Les résultats indiqués dans le tableau n° 20 montrent, qu'avec la membrane Millipore, tous les acides aminés se sont retrouvés dans le filtrat dans les mêmes proportions que dans le produit non filtré. Avec les membranes Diaflo UM2 et UM 05 une légère diminution du taux de certains acides aminés peut être observée, cependant il faut noter que ces membranes doivent être lavées à l'eau, avant utilisation, pour éliminer la glycérine dont elles sont recouvertes ; ce lavage ayant été fait dans la cellule elle-même, il est possible que, malgré les précautions prises, des traces d'eau susceptibles de diluer l'échantillon, soient restées sur l'appareil.

TABLEAU n° 20

DOSAGE des ACIDES AMINES DANS L' ECHANTILLON I
AVANT ET APRES FILTRATION

en grammes par litre.

	AVANT	APRES FILTRATION SUR		
		Millipore	Diaflo UM 2	Diaflo UM 05
Ac. cystéique	0,057	0,055	0,052	0,050
Acaspartique	0,69	0,64	0,54	0,56
Thréonine	0,94	0,92	0,86	0,88
Sérine	1,02	1,03	0,97	0,95
ac. glutamique	1,34	1,32	1,17	1,22
Proline	1,85	1,88	1,77	1,70
Glycine	0,28	0,25	0,23	0,22
Alanine	0,80	0,76	0,67	0,70
Valine	1,36	1,40	1,15	1,13
Cystéine	0	0	0	0
Méthionine	0,66	0,59	0,40	0,42
Isoleucine	1,05	1,07	0,96	1,02
Leucine	2,58	2,54	2,04	2,10
Tyrosine	0,06	0,07	0,06	0,05
Phénylalanine	1,42	1,41	0,91	1,03
Ornithine 2 ClH	0,034	0,032	traces	0
Lysine ClH	2,19	2,10	1,75	1,73
Tryptophane	traces	0	0	0
Histidine ClH	0,53	0,52	0,34	0,38
Arginine ClH	0,97	0,97	0,84	0,82

Ce qui est plus important pour nos recherches, c'est la présence de peptides dans le filtrat obtenu avec chacune de ces membranes, peptides qui ont été mis en évidence avec l'autoanalyseur muni des deux circuits.

Pouvons-nous en conclure que les peptides se trouvant dans les échantillons sont formés de molécules dont les poids moléculaires sont inférieurs aux limites indiquées ? Ce serait une conclusion trop rapide. En effet, des molécules linéaires, ayant des extrémités de petites sections, peuvent s'insinuer, dans des conditions d'écoulement hydrodynamique, à travers les pores de la membrane, et ainsi se trouve réalisé le passage de chaînes de poids moléculaire élevé.

III - Séparation des peptides sur Sephadex

Nous avons enfin appliqué, pour obtenir la séparation de la fraction peptidique des protéolysats, une technique qui nous a donné entière satisfaction, et qui est décrite par FAZAKERLEY et BEST (7). Le principe en est le suivant : les acides aminés forment à pH II, dans des conditions précises, avec la résine Séphadex G 25 et un sel de cuivre, un complexe qui reste fixé sur la résine, alors que les peptides, non complexés, peuvent être élués. Les acides aminés sont ensuite récupérés par élution à pH acide.

Les auteurs ont montré que la séparation est très bonne, et que la "quantité d'acides aminés récupérée est supérieure à 95 % dans le cas de huit acides aminés (Asp. Thr. Ser. Gly. Ala. Val. Ileu. Arg.) entre 90 et 95 % dans le cas de sept acides aminés (Glu. Pro. Leu. Tyr. Phe. Lys. et His.), égale à 86 % pour la méthionine et 82,5 % pour la cystine. L'ammoniaque est retenue avec les acides aminés.

Le mode opératoire est le suivant :

- Réactifs :

. "Séphadex G 25 Fine"

. Tampon tétraborate de sodium 0,05 M
amené à pH II avec de la soude 5 N

. Solution aqueuse de sulfate de cuivre 0,16 M

. Solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N

. Acide chlorhydrique 0,2 N

- Préparation de la colonne

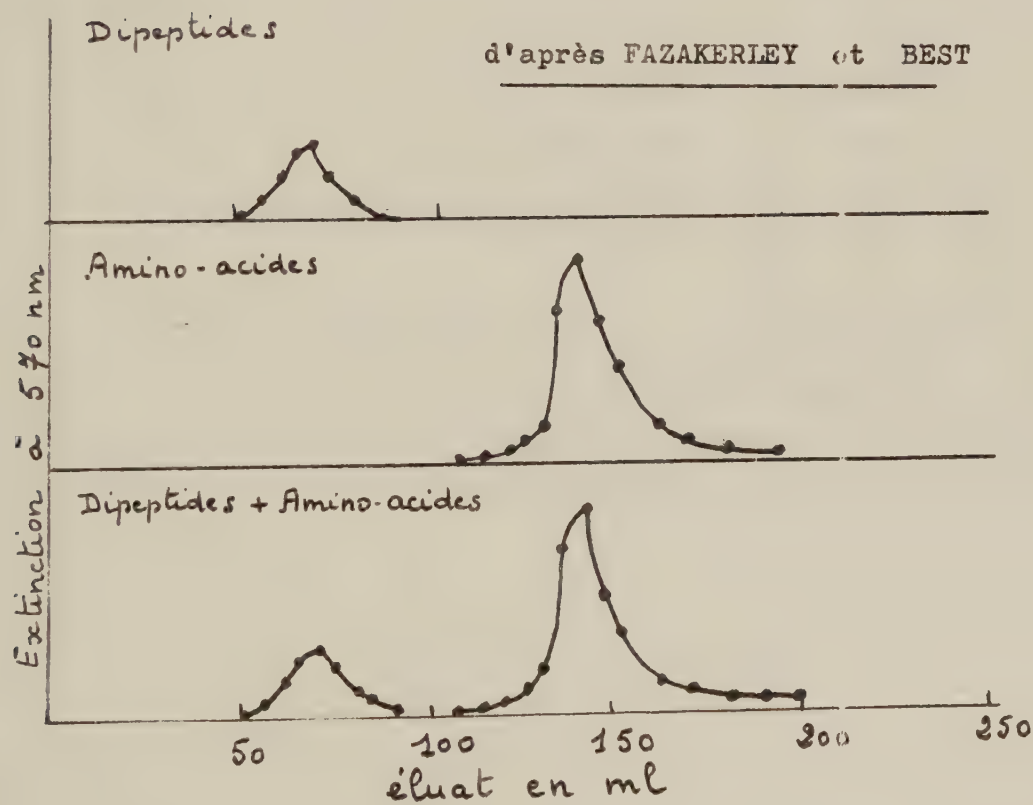
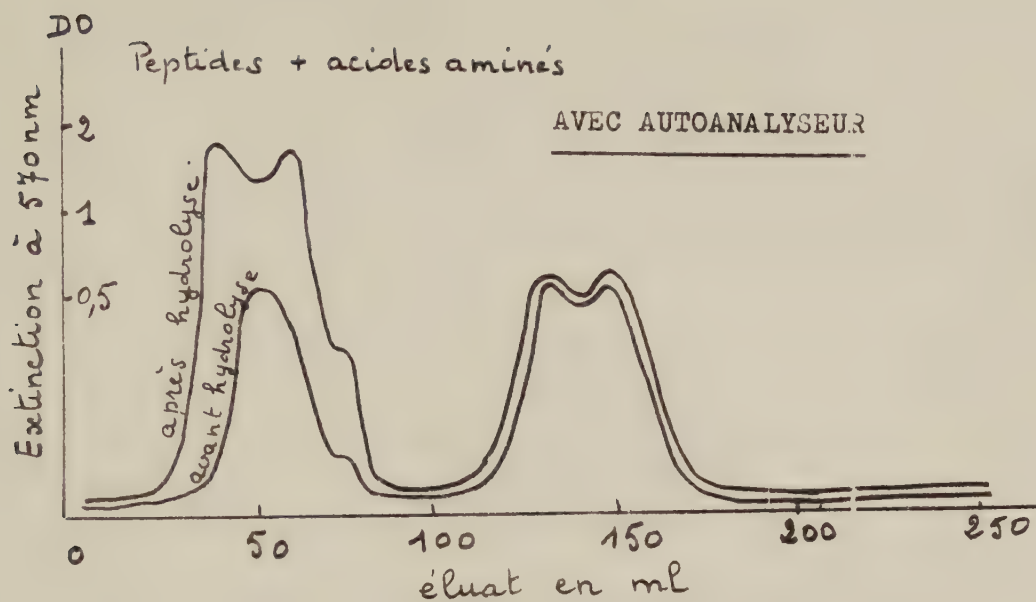
16 grammes de Séphadex G 25 placés dans un verre à pied sont mélangés soigneusement avec 30 ml de solution de sulfate de cuivre. Le mélange est alcalinisé par addition de 60 ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N, puis additionné de 50 ml de solution de tétraborate de sodium à pH II. Le complexe bleu sédimente rapidement, le surnageant est décanté et remplacé par 50 ml de solution de tétraborate ; après une nouvelle

décantation, le complexe Séphadex-cuivre est mis dans la colonne (2 x 50 cm), et lavé encore avec 50 ml de solution de tétraborate. Avec les dix derniers millilitres, la vitesse d'élu-tion est réglée à 30 ml/heure.

- Chromatographie d'un protéolysat :

L'échantillon, 1 ml de protéolysat (quantité moyenne à ajouter 10 à 40 mg d'acides aminés) est placé sur la colonne; après trois lavages successifs avec 1 ml de tétraborate, l'élution continue est mise en route avec la même solution de tétraborate. Lorsque 30 ml d'éluat sont collectés, l'élution est poursuivie avec de l'acide chlorhydrique 0,2 N. Les 95 premiers millilitres sont recueillis et représentent la fraction peptidique (qui est ajustée à 100 ml afin d'obtenir une dilution au 1/100 du protéolysat). Les 125 ml suivants sont **recueillis** séparément et représentent la fraction acides aminés libres (diluée au 1/125 par rapport au protéolysat). Il est important de respecter les quantités d'éluat indiquées, et non les temps d'élution, si le débit n'est pas rigoureusement réglé à 30 ml/h.

Afin de vérifier la bonne séparation des deux fractions, nous avons connecté le bas de la colonne à la pompe proportionnante de l'auto-analyseur muni du circuit d'hydrolyse, qui nous a permis de mettre en évidence la présence de deux pics, le premier correspondant bien à des peptides, et le second à des acides aminés libres. L'écart est assez net entre les deux pics pour que la séparation soit bonne, comme l'annonçaient les auteurs. Les courbes, ci-dessous, obtenues avec l'autoanalyseur, confirment bien les courbes données par les auteurs et que nous reproduisons pour permettre la comparaison.



- dosage de l'azote sur les différentes fractions :

Ayant obtenu par ce procédé, à partir des six protéolysats étudiés, deux fractions : l'une (A) renfermant les acides aminés, l'autre (P) renfermant les peptides, nous avons effectué des dosages d'azote, par la méthode de Kjeldahl, sur chacune d'elles.

TABLEAU n° 21

DOSAGE de l'AZOTE sur les
FRACTIONS SEPARÉES.

en grammes par litre.

	A	P	A + P calculé	T	Différence en %
Echantillon n° I	2,60	1,60	4,20	4,10	2,4
II	4.51	2.07	6.58	6,60	0.3
III	2.61	1.28	3.89	3.72	4.5
IV	2.65	2.27	4,92	5,45	9,7
V	3.30	0.55	3.85	3.66	5
VI	5.52	0.38	5.90	5.91	0,1

A = fraction acides aminés libres

P = fraction peptidique

T = protéolysat total.

Le tableau n° 21, qui comporte les résultats des dosages d'azote sur chacune des fractions A et P, et les quantités d'azote T déterminées préalablement sur les protéolysats purs, permet de constater que le total des deux fractions A + P est égal ou très voisin de la quantité totale d'azote T. La seule différence, un peu élevée, correspond à l'échantillon IV pour lequel le total des fractions séparées sur Séphadex 4,92 g/l est inférieur de 9,7 % à la quantité d'azote déterminée sur le protéolysat pur. Dans tous les autres cas, la différence est inférieure à 5 %. Il semble donc que les peptides et les acides aminés libres soient élués dans une proportion égale ou supérieure à 95 % (sauf dans I cas 90,3 %). Il est recommandé de procéder à un essai à blanc, qui sert de témoin, en effectuant une élution sans déposer d'échantillon sur la colonne. Les quantités d'azote dosées (1 à 2 mg/l selon la qualité de l'eau et des réactifs) sur les deux fractions sont déduites des quantités obtenues au cours des dosages sur les protéolysats.

TABLEAU n° 22
DOSAGE d'AZOTE CORRESPONDANT AUX ACIDES AMINES LIBRES
en grammes par litre.

	Fraction A Séphadex	Avec auto-analyseur.	différence en %
Echantillon n° I	2,60	2,53	2,7
II	4,51	4,25	6
III	2,61	2,21	15
IV	2,65	2,68	1
V	3,30	3,32	0,6
VI	5,52	5,40	2,2

Le tableau n° 22 permet de comparer les teneurs en azote correspondant à la fraction des acides aminés libres des protéolysats. Ces valeurs sont déterminées, d'une part, par dosage par la méthode de Kjeldahl sur la fraction séparée sur Séphadex, comme nous venons de le décrire ; d'autre part, d'après le calcul effectué à partir des quantités d'acides aminés dosées avec l'autoanalyseur (résultats donnés dans le tableau n° 7). Ce tableau montre que les résultats sont très voisins ; dans quatre cas sur six, la différence est égale ou inférieure à 2,7 %, dans le cas de l'échantillon II la différence est de 6 %. Avec un seul échantillon, le III, la différence est plus élevée : 15 %.

En conclusion, cette technique d'isolement des peptides et des acides aminés libres paraît applicable aux protéolysats injectables, dans les conditions que nous avons précisées.

IIIème PARTIE

MISE AU POINT d'une METHODE DE CONTROLE des PROTEOLYSATS INJECTABLES

Nous avons dit, en commençant ce travail, que les méthodes d'investigation susceptibles de donner des renseignements sur la composition et, par conséquent, sur la valeur nutritive des préparations injectables, se bornaient à la détermination de la teneur en azote total et de la teneur en azote α aminé, valeurs qui permettent de calculer le rapport :

$$\frac{N \alpha \text{ aminé}}{N \text{ total}}$$

La Pharmacopée USP XVIII indique que ce rapport ne doit pas être inférieur à 0,50, c'est à dire qu'au moins 50 % de l'azote total présent doit se trouver sous forme d'azote α aminé. Ce pourcentage a été repris pour la rédaction de la II6° note technique de Pro Pharmacopoea.

Que signifie un rapport $\frac{N \alpha \text{ aminé}}{N \text{ total}} > 0,50$?

La méthode de Sørensen dose l'azote α aminé des acides aminés libres et l'azote α aminé de l'acide aminé terminal (ou des acides terminaux) des polypeptides. Il y a donc deux facteurs qui jouent un rôle important sur la valeur du rapport $\frac{N \alpha \text{ aminé}}{N \text{ total}}$:

la proportion d'acides aminés basiques et la proportion de polypeptides.

L'absence d'acides polyaminés basiques, dont certains sont essentiels comme la lysine, le tryptophane, l'histidine et l'arginine, élève le rapport $\frac{N \alpha \text{ aminé}}{N \text{ total}}$. Un rapport trop proche de l'unité indiquerait une absence totale de ces acides aminés, ce qui déséquilibrerait la préparation.

La présence de peptides abaisse le rapport : un protéolysat exempt de peptides possède un rapport plus élevé qu'un échantillon riche en peptides.

Ces deux facteurs influençant le rapport $\frac{N_{\text{Aminé}}}{N_{\text{total}}}$ de façon opposée, il paraît indispensable de dissocier celui-ci et d'étudier, d'une part la fraction peptidique et, d'autre part, la fraction contenant les acides aminés libres.

RAPPORT N_A/N_T

La méthode que nous avons décrite, qui permet de séparer ces deux fractions, d'une façon rigoureuse, en mettant en oeuvre un procédé maintenant classique de chromatographie sur Séphadex, paraît facilement applicable aux protéolysats pour séparer la fraction peptidique P, qui est éliminée, et la fraction A, contenant les acides aminés libres, sur laquelle il est possible de faire un dosage d'azote par une microméthode de Kjeldahl. Cette quantité d'azote N_A , et la valeur N_T , correspondant à l'azote total du protéolysat, déterminé également par la méthode de Kjeldahl, permettent d'établir le rapport $\frac{N_A}{N_T}$, qui indique la proportion d'acides aminés libres dans les échantillons, proportion qu'il est intéressant de connaître, puisque ce sont eux qui sont utilisables directement par l'organisme.

Les rapports indiqués dans le tableau n° 23 ont été établis pour les six échantillons de protéolysats injectables que nous avons étudiés, et pour une solution extemporanée d'acides aminés.

TABLEAU N° 23
RAPPORT N_A/N_T POUR LES SIX ECHANTILLONS DE PROTEOLYSATS
et POUR UNE SOLUTION d'ACIDES AMINES.
en grammes/l

		N_A	N_T	Rapport N_A/N_T
Echantillon n°	I	2,60	4,10	0,63
	II	4,51	6,60	0,68
	III	2,61	3,72	0,70
	IV	2,65	5,45	0,48
	V	3,30	3,66	0,90
	VI	5,52	5,91	0,93
Sol. d'acides aminés		2,74	2,82	0,97

Nous constatons que ces rapports sont très voisins de l'unité dans le cas de la solution d'acides aminés 0,97 et dans le cas des échantillons V et VI, pour lesquels nous avons obtenu respectivement 0,90 et 0,93. Par contre, pour les autres échantillons de protéolysats, le rapport N_A/N_T est nettement moins élevé : il varie entre 0,63 et 0,70 pour les échantillons I, II et III ; il s'abaisse même jusqu'à 0,48 pour l'échantillon IV qui renferme la plus forte proportion de polypeptides.

Nous avons noté plus haut que, d'après les auteurs, 90 à 95 % des acides aminés étaient en général élués par la technique décrite par FAZAKERLEY et BEST, il ne faut donc pas s'attendre à un rapport égal à 1 avec une solution d'acides aminés synthétiques ; les résultats de nos propres essais confirment bien ces faits. En pratique les rapports obtenus au cours de nos différents essais ont varié de 0,95 à 0,99.

RAPPORT N_A/N_{α} aminé

Nous avons envisagé de doser l'azote α aminé dans cette fraction A, afin d'établir le rapport $\frac{N_A}{N_{\alpha}}$ qui

donnerait une indication sur la proportion d'acides polyaminés dont certains sont essentiels. La méthode de Sørensen, dosant l'azote α aminé, est inutilisable sur la fraction A, en raison de la présence de tétraborate qui joue le rôle de tampon. La méthode de M. VIGNERON (41), dosant l'azote aminé, est difficilement applicable. Il serait nécessaire, pour utiliser ces techniques, d'éliminer les sels qui se trouvent dans l'éluat en laissant intact les acides aminés.

Nous avons, cependant, pu établir ce rapport en utilisant les renseignements donnés par l'analyse des acides aminés libres avec l'autoanalyseur, et par calcul des quantités correspondantes d'azote. Rappelons ces rapports que nous avons déjà donnés plus haut (tableau n° 7).

TABLEAU N° 24

Rapports $\frac{N_A}{N_T} \alpha$ aminé pour les six échantillons de protéolysats.

Echantillon n° I	0,82
II	0,80
III	0,85
IV	0,80
V	0,93
VI	0,78

Ce tableau (N° 24) montre que l'échantillon VI, qui est le mieux équilibré en acides aminés, a le rapport le plus faible 0,78, alors que l'échantillon V, qui ne possède ni arginine, ni tryptophane, a un rapport élevé 0,93. Cependant, nous voyons que ce rapport varie peu, de 0,78 à 0,93, malgré la grande différence de composition des protéolysats ; il apporte donc moins de renseignements que le rapport $\frac{N_A}{N_T}$ et paraît moins indispensable pour juger de la qualité d'un échantillon. La mise en évidence par une méthode qualitative, telle que la chromatographie sur papier ou mieux en couche mince de cellulose, permettrait de vérifier simplement la présence ou l'absence de tel ou tel acide aminé indispensable. Ce simple essai donnerait presque autant de renseignements que le rapport $\frac{N_A}{N_T} \alpha$ aminé.

Quelle serait donc la méthode de contrôle qui pourrait être préconisée pour l'étude des protéolysats injectables? Il faut envisager deux cas : la mise au point d'un produit nouveau et le contrôle de routine d'une préparation déjà connue.

Dans le cas de la mise au point d'un produit nouveau, il est important de connaître bien exactement la composition de la matière première, ou, plus exactement, ce qu'elle devient après le traitement qui lui est appliqué. Il paraît alors indispensable d'effectuer une analyse complète par chromatographie et dosage de tous les acides aminés par la méthode physico- chimique automatisée. Seul ce dosage permet de connaître, avec exactitude, la proportion de chaque acide aminé dans la préparation. A partir de ces données, il est facile de déduire, par calcul, les valeurs : N_A correspondant à la quantité d'azote se trouvant sous forme d'acides aminés libres, et $N_A \alpha$ aminé, qui correspond à la quantité d'azote α aminé de cette fraction. Un dosage de l'azote total, par la méthode de Kjeldahl, sur l'échantillon de protéolysat lui-même, complète ces renseignements et permet d'établir les deux rapports :

$$\frac{N_A}{N_T} \quad \text{et} \quad \frac{N_A \alpha \text{ aminé}}{N_A} .$$

Avec ces essais, il est possible d'avoir une connaissance précise de la composition et donc de la valeur nutritive d'un protéolysat.

Une valeur limite serait à fixer pour chacun de ces rapports : $\frac{N_A}{N_T}$ devrait s'approcher le plus possible de l'unité, avec une valeur inférieure qui reste à déterminer.

$\frac{N_A \alpha \text{ aminé}}{N_A}$ devrait au contraire ne pas dépasser une certaine valeur, qui serait fixée de manière à assurer à la préparation la présence d'une certaine proportion d'acides polyaminés basiques.

Ce contrôle pourrait éventuellement être complété par un dosage microbiologique portant sur les acides aminés que l'organisme n'assimile que sous leur forme L naturelle, (lysine, leucine, isoleucine et thréonine).

Dans le cas d'un examen de routine d'une préparation déjà connue, une analyse détaillée, qui exige un matériel très spécial, paraît moins indispensable ; il s'agit d'effectuer un contrôle de la fabrication. La séparation de la fraction contenant les acides aminés libres, par la méthode de chromatographie sur Séphadex-cuivre, est alors à préconiser ; deux dosages d'azote par la méthode de Kjeldahl, l'un sur le protéolysat pur, l'autre sur la fraction des acides aminés libres isolée, permettent d'établir le rapport $\frac{N_A}{N_T}$, qui indique le degré d'hydrolyse de la matière première. La valeur de ce rapport devra correspondre aux normes établies au cours de l'étude préalable de la préparation.

Ces méthodes de contrôle nous paraissent donner des indications beaucoup plus exacts sur la préparation que le rapport jusqu'ici recommandé $\frac{N_{\alpha \text{ aminé}}}{N_{\text{total}}}$, ce que confirme l'examen du tableau n° 25, dans lequel nous avons regroupé, pour les six protéolysats examinés, les valeurs correspondant au rapport ancien et les valeurs correspondant aux deux rapports que nous préconisons.

TABLEAU n° 25

VALEUR des TROIS RAPPORTS pour les SIX PROTEOLYSATS

Echantillon	Rapport ancien	rapports que nous préconisons	
	$\frac{N_{\alpha \text{ aminé}}}{N_{\text{total}}}$	$\frac{N_A}{N_T}$	$\frac{N_A}{N_A}$
I	0,59	0,63	0,82
II	0,62	0,68	0,80
III	0,65	0,70	0,85
IV	0,55	0,48	0,80
V	0,87	0,90	0,93
VI	0,71	0,93	0,78

L'examen de ce tableau ainsi que l'examen du tableau n° 7 donné plus haut et qui indique la composition en acides aminés libres de chaque échantillon, montrent que le rapport jusqu'ici préconisé ne donnait pas de renseignements bien précis sur la valeur des préparations.

Les valeurs du rapport $\frac{N_{\alpha \text{ aminé}}}{N_{\text{total}}}$ pour les échantillons I et IV, 0,59 et 0,55 ne laissent pas soupçonner le degré d'hydrolyse très différent de ces deux préparations, ce que montre clairement les rapports $\frac{N_A}{N_T}$ 0,63 et 0,48.

L'échantillon V possède un rapport $\frac{N_{\alpha \text{ aminé}}}{N_{\text{total}}}$ élevé, 0,87, le plus élevé de ceux obtenus, mais si la valeur de $\frac{N_A}{N_T} = 0,90$ est très favorable, par contre la valeur :

$\frac{N_A \alpha \text{ aminé}}{N_A} = 0,93$ montre l'absence presque totale d'acides polyaminés basiques ; en effet, cet échantillon ne renferme ni arginine, ni tryptophane (voir tableau n° 7).

L'échantillon VI est celui qui possède le rapport $\frac{N_A}{N_T}$ le plus favorable 0,93, c'est celui qui renferme la plus forte proportion d'acides aminés libres directement assimilables et le rapport $\frac{N_A \alpha \text{ aminé}}{N_A}$ le plus favorable également 0,78, le plus bas de toutes les valeurs obtenues, grâce à la présence d'une forte proportion de lysine, de tryptophane et d'arginine. Le rapport $\frac{N_{\alpha \text{ aminé}}}{N_{\text{total}}}$ ne permettait pas de mettre ces qualités importantes en évidence.

C O N C L U S I O N

Nous avons montré, au cours de ce travail, tout d'abord qu'il est possible, avec une méthode automatique de dosage par chromatographie, de déterminer, avec une bonne précision, la teneur en acides aminés libres d'un protéolysat injectable. Nous avons comparé les renseignements obtenus avec ceux que l'on peut tirer des méthodes microbiologiques, et nous avons constaté les avantages et les inconvénients de chacune de ces techniques. Nous avons pu montrer que l'usage de la méthode physico-chimique automatisée donne une analyse beaucoup plus complète des échantillons, malgré l'absence de différenciation entre les formes L et DL des acides aminés.

L'étude de six protéolysats, prélevés au hasard, parmi les préparations commercialisées, nous a permis de mettre en évidence une très grande variation dans la composition de ces préparations, variation qui porte aussi bien sur la teneur en différents acides aminés libres que sur la teneur en azote total, et sur la présence éventuelle de polypeptides.

Nous avons pu mettre en évidence la présence de polypeptides, et, pour séparer cette fraction, après différentes tentatives infructueuses mettant en oeuvre la chromatographie sur résine chromobeads A ou l'ultrafiltration sur membrane, nous avons adapté une technique décrite par FAZAKERLEY et BEST.

Cette méthode, que nous avons vérifiée et adaptée au contrôle des protéolysats, est basée sur la formation d'un complexe des acides aminés libres avec le S éphadex G 25 en présence d'un sel de cuivre. Cette technique nous a permis de séparer la fraction contenant les acides aminés libres après élimination de la fraction peptidique.

Ayant constaté que le rapport $\frac{N\alpha_{\text{aminé}}}{N_{\text{total}}}$, considéré jusqu'ici comme le seul critère de la qualité des protéolysats injectables, est influencé par deux facteurs : la proportion d'acides polyaminés basiques et la proportion de polypeptides éventuellement présent dans la préparation, nous avons remplacé ce rapport par deux rapports différents. L'un $\frac{N_A}{N_T}$ indique la proportion d'acides aminés libres, N_A représentant la quantité d'azote se trouvant sous forme d'acides aminés libres, valeur mesurée par la technique de Kjeldahl sur la fraction séparée sur Séphadex, et N_T étant égal à la quantité totale d'azote dans l'échantillon de protéolysat. L'autre $\frac{N_A \alpha_{\text{aminé}}}{N_A}$ indique la proportion d'acides polyaminés basiques, $N_A \alpha_{\text{aminé}}$ étant calculé à partir des quantités de chaque acide aminé, déterminées par dosage avec l'autoanalyseur.

L'établissement de ces deux rapports donne une indication très exacte de la composition d'un protéolysat injectable, donc de sa valeur nutritive.

En conclusion, nous proposons deux protocoles de contrôle pour l'étude des protéolysats injectables :

- le premier concerne la mise au point ou le contrôle d'un produit nouveau. Dans ce cas, nous préconisons une analyse détaillée de l'échantillon, effectuée grâce à la méthode physico-chimique automatisée qui permet de connaître la composition exacte en acides aminés libres. De ces chiffres peuvent être déduits par calcul la quantité N_A d'azote se trouvant sous forme d'acides aminés libres et le taux $N_A \alpha_{\text{aminé}}$, qui correspond à l'azote $\alpha_{\text{aminé}}$ de cette fraction. Ces données et un dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl sur le protéolysat, permettent d'établir les deux rapports :

$$\frac{N_A}{N_T} \text{ indiquant la proportion d'acides aminés libres,}$$

$$\frac{N_A \alpha_{\text{aminé}}}{N_A} \text{ indiquant la proportion d'acides polyaminés basiques.}$$

Un dosage microbiologique pourrait éventuellement compléter cette étude, et montrer si les acides aminés essentiels se trouvent sous la forme L naturelle ou sous la forme racémique, en comparant les résultats obtenus avec ceux donnés par l'autoanalyseur.

- le second protocole s'applique au contrôle de routine d'une préparation dont la matière première a déjà été étudiée. Dans ce cas, la composition en acides aminés étant considérée comme connue, il est surtout nécessaire de contrôler le degré d'hydrolyse, c'est à dire, la fabrication du protéolysat. Nous préconisons alors une séparation de la fraction contenant les acides aminés libres de la fraction peptidique par chromatographie utilisant le Séphadex : en présence de sel de cuivre.

Un dosage de l'azote N_A de cette fraction isolée, et un dosage de l'azote total N_T sur le protéolysat lui-même, permettent d'établir le rapport $\frac{N_A}{N_T}$ qui indique la proportion d'acides aminés présents dans la préparation, et donne une très bonne indication de la valeur nutritive de l'échantillon étudié.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - J. ADRIAN : Nouvelle technique pour le dosage microbiologique simultané des acides aminés indispensables et conditions de leur extraction en présence de glucides.
Bull. Sté Chim. Biol. 1955, 37, 107
- 2 - J. ALLISON : Interpretation of nitrogen balance data.
Fed. Proc. 1951, 10, 676
- 3 - J. ALLISON, R.D. SEELEY et F.P. FERGUSON : The interpretation of nitrogen balance data.
J. biol. Chem. 1947, 171, 91.
- 4 - J. BERNARD : Contribution à l'étude analytique des protéolysats injectables.
1ère partie : Ann. Pharm. Fr. 1967, 25, 89
2ème partie : Ann. Pharm. Fr. 1971, sous presse.
- 5 - J.E. COURTOIS et R. PERLES : Précis de Chimie biologique.
Masson édit. Paris 1960, p. 165.
- 6 - J.C. DELARUE : Chromatographie des amino-acides sur résine échangeuse d'ions. Modification proposée de la méthode de Padieu et Maleknia.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1966, 48, 364.
- 7 - S. FAZAKERLEY et D.R. BEST : Separation of amino Acids, as copper chelates, from amino acid, protein and peptide mixtures.
Anal. Biochem. 1965, 12, 290
- 8 - L. FRIDMAN et KLINE O. : The relation of amino acids sugar reaction to the nutrition value of protein hydrolysates.
J. Nutr. 1950, 40, 225
- 9 - G. GAZET du CHATELIER : Les préparations injectables utilisées comme sources d'azote dans certains "états de nutrition" : protéolysats, hydrolysats, solutés d'amino-acides.
Revue française de la Pharmacie 1969 n° II, 19
- 10 - R. GUTHRIE - in LELUC. J. Am. Med. Assoc. 1961, 178, 883.
Proposal to the children's Bur. Jan. 1962.
U.S. Dept. Health Education and Welfare, Children's Bur.
Feb. 5, 1962.

- 11 - A.F. HARTMANN, H.J. LAWLER et C.S. MEEKER : J. Pédiatr. 1944, 24, 371
- 12 - A.F. HARTMANN, C.F. MEEKER, A.M. PERLEY et H.G. Mc GINNTS :
J. Pediatr. 1942, 20, 308
- 13 - D.H. HEGSTED et C.E. ALVISTUR : Microbiologic assay for niacin.
Effect of total volume per tube on accuracy
Ind. Eng. Chem. anal. ed. 1952, 24, 1635
- 14 - H. KAMIN et HANDLER P. : Effect of infusion of single amino acid upon
excretion of others amino acids.
Ann. J. Physiol., 1951, 164, 654
- 15 - H. KAMIN et P. HANDLER : The metabolism of parenterally administred
amino acids
J. Biol. Chem. 1951, 188, 193 et 193, 872
- 16 - G. LAROCHE et J. TREMOLIERES : La dénutrition azotée au cours des
affections médicales.
Ann. méd. 1949, 50, 1055 et 1948, 49, 277
- 17 - L. LEGER : Administration par voie veineuse d'une solution assimilable
de protéines chez les malades chirurgicaux.
Presse médicale 1946 n° 58 801
- 18 - R. LELUC : Analyse chimique et microbiologique d'un protéolysat
naturel : le Nuoc Mam - Utilisation des antagonistes
analogues de certains acides aminés pour leur dosage
microbiologique dans le Nuoc Mam et dans les protéolysats
médicamenteux.
Thèse Paris 1969 soutenue à la Faculté de Pharmacie.
- 19 - S. LEVEY, J. HARROUN et SMYTH : Serum glutamic acid levels and the
occurence of nausea and vomiting after the I.V. adminis-
tration of amino acids mixtures.
J. Lab. Clin. Med. 1949, 34, 1233.
- 20 - F. LIDSTROM : Clinical and experimental studies on I.V. nutrition
with a dialized enzymatic casein hydrolysate.
Acta chirurgica scandin. suppl. 1954, 186.
- 21 - S.C. MADDEN, L.J. ZELDIS, A.D. HENGERER, L.M. MILLER, A.P. ROWE,
A.P. TURNER et G.H. WHIPPLE : Blood substitutes and blood
transfusion 1942 Mudd. and Thallner ed. Springfield,
Illinois.
J. exp. Med. 1943. 77, 277 et 1945, 82, 65

- 22 - J.H. MAGNUSSON : Amino acid mixtures as an additional food for premature infants. *Nature* 1944, 154, 91
- 23 - P. MONNIER, R. HUGUET et J. GRAS : Etude chromatographique comparée de quelques hydrolysats industriels.
Soc. Pharm. Montpellier 1958, séance du 8 Mars.
- 24 - A.J. MUELLER, K.S. KEMMERER, W.M. COX, et S.T. BARNES : The effect of **casein** and a casein digest on growth and serum protein regeneration.
J. of biol. chem. 1940, 134, 573
- 25 - H. MUNRO et THOMSON : Influence of glucose on amino acids metabolism. *Metabolism* 1953, 11, 354
- 26 - P. PADIEU et N. MALEKNIA : Sur un nouveau système de tampons volatils pour la chromatographie des acides aminés sur résine échangeuse de cations.
Bull. Soc. Chim. biol. 1965, 47, 493
- 27 - J. PHILIPPE : Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie. 1967, Masson ed.
- 28 - Pro Pharmacopoea : note 72 Solutions anabolisantes injectables d'amino-acides.
Ann. Pharm. Fr. 1961, 19, 136
note 115 : Solutions anabolisantes injectables d'amino-acides.
Ann. Pharm. Fr. 1963, 21, 261
note 116 : Protéolysats et hydrolysats injectables.
Ann. Pharm. Fr. 1963, 21, 263
- 29 - G.B. RAMASAMA : Amino acid mixture as ~~parenteral~~ protein food.
Surg. gyn. Obst. 1951, 2, 105
- 30 - C. RICI et J. STRICKLER : The reduced incidence of systeme reactions when using a low glutamic acid mixture. *The Am. J. Clin. Nutr.* Janvier 1957
- 31 - RIEGEL : Mixtures as parenteral protein food. A collective review.
Surg. Gyn. Abst. 1951 n° 2 105
- 32 - W.C. ROSE, W.J. HAINES et JOHNSON J.E. : The role of the amino acids in human nutrition.
J. of biol. chem. 1942, 146, 683

- 33 - W.C. ROSE, W.J. HAINES, JOHNSON et D.T. WARNER : Further experiments on the role of the amino acids in human nutrition.
J. of biol. chem. 1943, 148, 457
- 34 - W.C. ROSE et R. WIXOM : The amino acids requirements of man. XVI.
The role of azote intake. J. of biol. chem. 1955, 217, 997
- 35 - M. ROUX : Note sur les essais physiologiques des hydrolysats de protéines injectables.
Ann. Pharm. Fr. 1959, 3, 211
- 36 - G. SCHUSTER et G. AUFAUVRE : Contribution à l'étude des protéolysats
Ann. Pharm. Fr. 1949, 7, 195
- 37 - J. TREMOLIERES, A. MOSSE, J. PASCHOUD-FARQUET et A. MAZER : Effets sur le bilan azoté de perfusions veineuses d'un mélange d'acido-amino chez l'homme.
Thérapie 1958, 13, 979
- 38 - J. TREMOLIERES : L'utilisation des mélanges d'acido-amino chez l'homme.
Acta pharmacol. II^e série 1958, 259.
- 39 - J. TREMOLIERES : Les acido-amino dans l'alimentation parentérale.
Cahier n° 3 des Monographies publiées par l'Alimentation Equilibrée de Commeny, Paris 1959.
- 40 - M. VIGNERON et R. JACQUOT : Acido-amino, peptides, protéines.
Cahier n° 2 des Monographies publiées par l'Alimentation Equilibrée de Commeny, Paris 1958.
- 41 - M. VIGNERON : Détermination par titrage potentiométrique de l'azote aminé libre de quelques acido-amino, peptides et protéines.
Ann. Pharm. Fr. 1960, 18, 404
- 42 - WEINSTEIN : cité par TREMOLIERES (39)
- 43 - A. WILKINSON, B. BILLING, C. NAGY et C. STEWART :
Nitrogen metabolism after surgical-operations use of a protein hydrolysate after partial gastrectomy.
The Lancet 1950, 258, 533
- 44 - J.F. WORBE et C. BACQUES : Influence de la lysine sur la glycémie et le taux de glycogène hépatique chez le rat.
C.R. Soc. biol. 1964, 158, 2116

T A B L E D E S M A T I E R E S

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>Ière PARTIE</u>	
Analyse des acides aminés libres	6
Chapitre I : Protocole expérimental	7
Chapitre II : Etude de deux solutions d'acides aminés	21
Chapitre III : Etude des protéolysats	25
Chapitre IV : Méthodes de dosage microbiologique	
A - méthode d'ADRIAN	38
B - méthode de LELUC	75
C - comparaison des résultats obtenus avec les trois techniques décrites	92
<u>IIème PARTIE</u>	
Etude des peptides dans les protéolysats injectables	100
Chapitre I : Mise en évidence des peptides	101
1° - analyse des protéolysats après hydrolyse complémentaire totale	101
2° - mise en évidence des peptides avec l'autoanalyseur à deux circuits	104
Chapitre II : Séparation des peptides	111
I - Séparation des peptides avec l'autoanalyseur	111
II - Utilisation de la filtration sur membrane	120
III - Séparation des peptides sur Séphadex	124
<u>IIIème PARTIE</u>	
Mise au point d'une méthode de contrôle des protéolysats injectables	130
<u>CONCLUSION</u>	137
Bibliographie	140
Table des matières	144

